

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y GESTIÓN FORESTAL Y AMBIENTAL
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MONTES

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID



**APLICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA
A LA RESTAURACIÓN DEL PATRIMONIO
BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL EN PAPEL**

SARA M. SANTOS DE DIOS

Ingeniera de Montes

DIRECTORES

Juan Carlos Villar Gutiérrez

Dr. en Ciencias Químicas

M. Eugenia Eugenio Martín

Dra. en Ciencias Químicas

MADRID 2015

**Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad
Politécnica de Madrid, el día.....de.....de 2015.**

Presidente D. Luis Jiménez Alcaide.

Vocal D. Francisco Rodríguez Somolinos.

Vocal D^a. Ruth Viñas Lucas.

Vocal D. Miguel Ladero Galán.

Secretaria D^a. Cristina Molleda Clara.

Realizado del acto de defensa y lectura de la Tesis el día.....
de de 2015 en Madrid.

Calificación.....

EL PRESIDENTE

LOS VOCALES

LA SECRETARIA

"Tengo un amigo artista que suele adoptar una postura con la que yo no estoy muy de acuerdo. Él sostiene una flor y dice: «Mira qué bonita es», y en eso coincidimos. Pero sigue diciendo: «Ves, yo, como artista, puedo ver lo bello que es esto, pero tú, como científico, lo desmontas todo y lo conviertes en algo anodino». Y entonces pienso que está diciendo tonterías. [...] Yo veo mucho más en la flor que lo que ve él. Puedo imaginar las células que hay en ella, las complicadas acciones que tienen lugar en su interior y que también tienen su belleza. [...] Toda clase de interesantes cuestiones de la ciencia que no hacen sino sumarle misterio e interés a la impresión que deja una simple flor, no entiendo cómo podría restárselo".

Richard P. Feynman

"¡Libros! ¡Libros!. He aquí una palabra mágica que equivale a decir 'amor, amor', y que debían los pueblos pedir como piden pan".

Federico García Lorca

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que, de un modo u otro, me han ayudado y animado durante los años de la realización de esta tesis doctoral. Ha sido un proceso largo, por lo que son muchas las personas a las que tengo que dar las gracias.

En primer lugar a mi director de tesis, el Dr. Juan Carlos Villar, que ha dirigido mi trabajo aportando ánimos y soluciones, y, sobre todo, depositando su confianza en mí y en esta línea de trabajo que sólo hace algunos años parecía tan extraña. Él me abrió, hace ya once años, las puertas del laboratorio de Celulosa y Papel. Gracias por dejarme decidir, gracias por dejarme equivocarme. A la Dra. María Eugenia Eugenio, codirectora de esta tesis, por ofrecerme sus consejos y sus conocimientos, pero, sobre todo, porque siempre ha estado dispuesta a ayudarme. Gracias por tus palabras y por tu tiempo.

A la Biblioteca Nacional de España, en especial al laboratorio de restauración, donde siempre he recibido la ayuda que he necesitado. Gracias a Luis Crespo por compartir conmigo sus conocimientos y su espíritu valiente. Y, como no, a Arsenio Sánchez, que ha sido el asesor constante de esta tesis, aunque en algunas ocasiones he tenido que perseguirle. Gracias por guiarme en el apasionante mundo de la restauración y, sobre todo, gracias por ser la chispa que comenzó todo este trabajo una mañana en que soltó, sin pensar, “¿sabes que hay unas bacterias que producen celulosa?”.

A Miguel Ladero, por su ayuda con la parte de microscopía electrónica de barrido y rayos-X, gracias por recibirme siempre con una sonrisa, a cualquier hora que fuera necesario.

A Paulo Ferreira, que se ocupó de los ensayos de porosimetría por intrusión de mercurio, y que consigue que, siempre que hablo con él, todo parezca tranquilo y fácil.

A Gary Chinga-Carrasco, por sus análisis de perfilometría láser, pero, sobre todo, por sus WhatsApps que me hacen sonreír, y sus conversaciones. Esperemos que este sea el comienzo de una larga serie de trabajos en común.

A toda la gente que me ha acompañado en el laboratorio a lo largo de todos estos años, por los momentos vividos juntos, muchos ya, tanto dentro como fuera del laboratorio. En especial a mis compañeros del alma, Esteban y Chema. Es indescriptible la sensación de saber que, si estáis vosotros, todo va a salir bien. Gracias, Esteban, por la seguridad que siempre me das, por saber hacerlo todo siempre tan bien y por estar siempre dispuesto a echarme una mano. Gracias, Chema, un amigo, un padre, un hermano. Esta tesis también es tuya

A Serfa, que me enseñó, con esa elegancia que sólo él tiene, a “mirar por el tubo”, su “magic touch” y, como no, a distinguir el *Liquidambar*. A Reme, con ese ojo inigualable para ver la dirección de la fibra, la cantidad de harina que necesita un bizcocho, y el momento exacto en el que alguien necesita una palabra dulce. A Carlos, siempre sonriendo, siempre dispuesto a hacer una broma y que, aunque baile mejor que canta, es mi bajo favorito. A Nuria, que nunca ha dudado cuando le he pedido ayuda, con los ángulos de contacto, la porosimetría, leyendo y corrigiendo capítulos y, como no, chismorreando en la comida juntas desde hace ya más de diez años.

A David que, además de compañero de trabajo y cafés, se ocupó de efectuar los ensayos de espectroscopía infrarroja. Gracias por ayudarme con tus conocimientos y tu dedicación. A Raquel y Úrsula, con las que comparto mesa, historias y congresos, con las que es un placer hablar cada mañana. Y a Puri, la última incorporación del laboratorio, por estar siempre dispuesta a echar una mano. Gracias a todos por vuestro apoyo.

Y, por supuesto, a todos los que han pasado y que, de alguna manera, también han compartido conmigo momentos de trabajo: Ester, Laura, Miriam, Pedro, Ana Filipa, Jesús, Luisa y Bárbara. No quiero dejarme en el tintero a Victoria Baonza, la persona que me recibió con los brazos abiertos, hace ya once años, en el INIA, gracias, tú estás en el principio.

A Dori, Toñi y Bea, no quiero ni pensar qué va a ser del CIFOR sin vosotras, sin vuestra diligencia, sin vuestra ayuda, sin esos ratos de charla porque sí en secretaría.

Al club de los poetas que, cada día, echan mano de su imaginación para que, al menos durante un rato, el mundo sea más bonito. Sois los últimos caballeros que quedan, no lo olvidéis nunca.

A mi familia, por su cariño y apoyo constante. Mis padres han hecho de mí esta cabezota que soy, aprendiendo que, con constancia y trabajo, todo puede lograrse. A mi padre, de quien heredé la ironía y, todo hay que decirlo, el mal genio. Así que ya sabéis de quién es la culpa. A mi madre, la persona con más paciencia y más amor que conozco, que grabó a fuego en mi cabeza un profundo amor y respeto por todo lo que esté vivo, no sabes en qué lío me has metido. A mi hermano, ese al que no me parezco, por los años que hemos compartido juntos y que, sin duda, han hecho de nosotros lo que somos.

A mis amigos, a los que ni recuerdan ya que estaba haciendo una tesis y a los que siguen preguntando si ya la he terminado. Por el apoyo, las risas, las lágrimas, los abrazos...Sin vosotros, nada. Volveré.

A la gente que ha aparecido hace poco en mi vida, Moncho, Vanesa, Vicky, y que me demuestra día a día que la generosidad sin límites existe y que, sí, se puede.

Y, aunque haya a quien pueda parecerle raro, a los animales que me han acompañado en mi vida y a los que lo siguen haciendo, porque ellos son parte de lo que yo soy. A Zoska y Puck, porque aunque ya se marcharon de mi lado, nunca se irán de mi corazón. Gracias por jugar conmigo, gracias por sacarme de paseo, gracias por pasar tiempo conmigo. Y a los que ahora están, dentro y fuera: Teo, Pipa, Nano, Olivia, Micky, Lula, Felisa, Santi, Capitán, Cachorrito y su mamá, Amiguita, Olivita, Larguirucho, Rubito, Tomás...porque no hay espacio suficiente para explicarlo. Como alguien dijo, "quien no entiende una mirada no entiende una larga explicación".

Y por último quiero dar las gracias a Fernando. Sé que no soy una persona fácil, soy cabezota, tengo mal genio y, sobre todo, ando siempre embarcándome en aventuras un tanto surrealistas. Gracias por dejarme hacer, gracias por entender que esas historias también soy yo, pero gracias, sobre todo, por respetar aquello que no entiendes. Gracias.

INDICE	I
RESUMEN	VI
SUMMARY	IX

I. INTRODUCCIÓN1

1. UN POCO DE HISTORIA3

1.1. Comenzando por el principio.....3

1.2. Papeles de trapos.....5

1.3. El uso de la madera.....7

2. LA DESAPARICIÓN DEL PATRIMONIO.....9

2.1. El descubrimiento del desastre9

2.2. Soluciones actuales..... 12

2.3. La alternativa 14

3. LA CELULOSA..... 15

3.1. Fuentes de celulosa 15

3.2. Celulosa vegetal 15

3.2.1. Composición química de la madera 15

3.2.2. Ultraestructura de la pared celular 22

3.3. Celulosa bacteriana 25

3.3.1. Generalidades 25

3.3.2. Estructura y características 27

3.3.3. Funciones 30

3.3.4. Biosíntesis 32

3.3.5. Factores que afectan a la producción 34

3.3.5.1. Medio de cultivo..... 35

3.3.5.2. Temperatura y pH..... 37

3.3.5.3. Técnicas de cultivo 37

3.3.6. Purificación	41
3.3.7. Aplicaciones.....	42
II. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	47
1. OBJETIVOS	48
2. ESTRUCTURA DE LA TESIS	49
2.1. Optimización del medio de cultivo	49
2.2. Caracterización de la celulosa bacteriana optimizada	50
2.3. Procesos de restauración	50
2.3.1. Material a restaurar	50
2.3.2. Materiales de refuerzo.....	51
2.3.3. Laminación	51
2.3.4. Generación de celulosa bacteriana <i>in situ</i>	52
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
1. MATERIAL A RESTAURAR.....	55
2. MATERIALES DE REFUERZO	57
2.1. Papel japonés	57
2.2. Celulosa bacteriana	57
2.2.1. Organismo y mantenimiento.....	57
2.2.2. Obtención del inóculo	59
2.2.3. Producción de celulosa bacteriana	60
2.2.3.1. Capas de celulosa bacteriana	60
2.2.3.2. Generación de celulosa bacteriana <i>in situ</i>	62
2.2.4. Métodos de purificación de la celulosa bacteriana	64
2.2.4.1. Método alcalino	64
2.2.4.2. Otros métodos	65
3. PROCESO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO.....	66

4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN	67
4.1. Caracterización del medio residual	67
4.2. Propiedades físico-mecánicas.....	67
4.2.1. Gramaje	67
4.2.2. Espesor.....	68
4.2.3. Resistencia mecánica.....	68
4.2.4. Resistencia de adhesión interna	69
4.3. Propiedades físico-químicas	69
4.3.1. Medida del pH	69
4.3.2. Viscosidad	70
4.3.3. Difracción de rayos-X	70
4.3.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	71
4.4. Propiedades ópticas	71
4.4.1. Blancura.....	72
4.4.2. Amarilleamiento	72
4.4.3. Opacidad	72
4.4.4. Coordenadas CIELab	73
4.4.5. Brillo especular	73
4.5. Propiedades superficiales	73
4.5.1. Ángulos de contacto	74
4.5.2. Microscopía óptica.....	75
4.5.3. Perfilometría láser	76
4.6. Propiedades estructurales	77
4.6.1. Porosidad Gurley	77
4.6.2. Porosimetría por intrusión de mercurio	78
4.6.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	78
5. MÉTODOS DE RESTAURACIÓN	79
5.1. Laminación	79
5.1.1. Preparación del adhesivo	79

5.1.2. Proceso de laminación	81
5.2. Generación de celulosa bacteriana <i>in situ</i>	84
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
1. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	87
1.1. Selección de la fuente de carbono	88
1.2. Selección de las fuentes de nitrógeno	93
1.3. Evaluación del efecto del etanol	97
1.4. Conclusiones	100
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CAPAS DE CELULOSA BACTERIANA.....	102
2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	105
2.2. Difracción de rayos-X	108
2.3. Viscosidad	109
2.4. Porosimetría por intrusión de mercurio	111
2.5. Ángulos de contacto estáticos y dinámicos	113
2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	114
2.7. Propiedades mecánicas y ópticas	117
2.8. Conclusiones	120
3. PROCEDIMIENTOS DE RESTAURACIÓN.....	121
3.1. Papeles a restaurar	121
3.2. Laminación	124
3.2.1. Celulosa bacteriana <i>versus</i> papel japonés.....	124
3.2.2. Selección del adhesivo	127
3.2.3. Papeles modelo laminados	128
3.2.3.1. Propiedades mecánicas	128
3.2.3.2. Propiedades ópticas	129
3.2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	133
3.2.3.4. Perfilometría láser	135

3.2.3.5. Porosidad Gurley	136
3.2.3.6. Ángulos de contacto estáticos y dinámicos.....	137
3.2.3.7. Conclusiones	141
3.2.4. Libros laminados	142
3.2.4.1. Propiedades mecánicas	143
3.2.4.2. Propiedades ópticas	144
3.2.4.3. Estudios microscópicos	146
3.2.4.4. Perfilometría láser	147
3.2.4.5. Porosidad Gurley	149
3.2.4.6. Ángulos de contacto estáticos y dinámicos.....	150
3.2.4.7. Conclusiones	152
3.3. Generación de celulosa bacteriana <i>in situ</i>	153
3.3.1. Propiedades mecánicas	155
3.3.2. Propiedades ópticas	159
3.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	165
3.3.4. Porosidad Gurley	166
3.3.5. Ángulos de contacto estáticos y dinámicos.....	168
3.3.6. Conclusiones	172
V. CONCLUSIONES	174
VI. BIBLIOGRAFÍA	178
VII. ANEXOS.....	197

RESUMEN

La preservación del patrimonio bibliográfico y documental en papel es uno de los mayores retos a los que se enfrentan bibliotecas y archivos de todo el mundo. La búsqueda de soluciones al problema del papel degradado ha sido abordada históricamente desde dos líneas de trabajo predominantes: la conservación de estos documentos mediante la neutralización de los ácidos presentes en ellos con agentes alcalinos, y su restauración mediante el método de laminación fundamentalmente con papel de origen vegetal. Hasta el día de hoy, el desarrollo de tratamientos basados en biotecnología en la conservación del patrimonio documental ha sido muy escaso, aunque la capacidad de ciertas bacterias de producir celulosa lleva a plantear su uso en el campo de la conservación y restauración del papel. La celulosa bacteriana (CB) es químicamente idéntica a la celulosa vegetal, pero su organización macroscópica es diferente. Sus propiedades únicas (alto grado de cristalinidad, durabilidad, resistencia y biocompatibilidad), han hecho de este material un excelente recurso en diferentes campos.

En el desarrollo de esta tesis se ha estudiado el uso de la celulosa, de alta calidad, generada por la bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291, para restaurar documentos deteriorados y consolidar los que puedan estar en peligro de degradación, evitando así su destrucción y proporcionando al papel que se restaura unas buenas propiedades mecánicas, ópticas y estructurales. Se desarrollan asimismo dos protocolos de trabajo que permiten la aplicación de dicha celulosa.

En primer lugar se seleccionó el medio de cultivo que proporcionó una celulosa adecuada para su uso en restauración. Para ello se evaluó el efecto que tienen sobre la celulosa generada las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo, manteniendo como parámetros fijos la temperatura y el pH inicial del medio, y efectuando los ensayos en condiciones estáticas. Se evaluó, también, el efecto que tiene en la CB la adición de un 1% de etanol al medio de cultivo. Las capas de celulosa se recolectaron a cuatro tiempos distintos, caracterizando en cada uno de ellos el medio de cultivo (pH y consumo de fuente de carbono), y las capas de CB (pH, peso seco y propiedades ópticas y

mecánicas). La mejor combinación de fuentes de carbono y nitrógeno resultó ser fructosa más extracto de levadura y extracto de maíz, con o sin etanol, que proporcionaban una buena relación entre la producción de celulosa y el consumo de fuente de carbono, y que generaban una capa de celulosa resistente y homogénea. La adición de etanol al medio de cultivo, si bien aumentaba la productividad, causaba un descenso apreciable de pH.

Las capas de CB obtenidas con los medios de cultivo optimizados se caracterizaron en términos de sus índices de desgarrar y estallido, propiedades ópticas, microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos-X, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), grado de polimerización, ángulos de contacto estáticos y dinámicos, y porosimetría de intrusión de mercurio. Por otro lado hay que tener en cuenta que el material restaurado debe ser estable en el tiempo. Por ello esta misma caracterización se efectuó tras someter a las capas de CB a un proceso de envejecimiento acelerado. Los resultados mostraron que la CB resultante tiene un elevado índice de cristalinidad, baja porosidad interna, buenas propiedades mecánicas, y alta estabilidad en el tiempo.

Para desarrollar los protocolos de trabajo que permitan la restauración con esta celulosa optimizada, se comenzó con un proceso de selección de los papeles a restaurar. Se eligieron tres tipos de papeles modelo, hechos con pasta mecánica, química y filtro (antes y después de ser sometidos a un proceso de envejecimiento acelerado), y tres libros viejos adquiridos en el mercado de segunda mano. Estos ejemplares a restaurar se caracterizaron también en términos de sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas.

El primer protocolo de restauración con CB que se evaluó fue el denominado laminación. Consiste en aplicar un material de refuerzo al documento mediante el uso de un adhesivo. Se seleccionó para ello la CB producida en el medio de cultivo optimizado con un 1% de etanol. Se aplicó un método de purificación alcalino (1 hora a 90 °C en NaOH al 1%) y como adhesivo se seleccionó almidón de trigo. El proceso de laminación se efectuó también con papel japonés (PJ), un material habitualmente utilizado en conservación, para comparar ambos materiales. Se concluyó que no hay diferencias significativas en las características estudiadas entre los dos tipos de materiales de refuerzo. Se caracterizó el material reforzado y, también, éste después de sufrir un

proceso de envejecimiento acelerado. Los papeles laminados con CB mostraban diferencias más marcadas en las propiedades ópticas que los restaurados con PJ, con respecto a los originales. Sin embargo, el texto era más legible cuando el material de restauración era la CB. La mojabilidad disminuía con ambos tipos de refuerzo, aunque en los papeles laminados con CB de manera más marcada e independiente del material a restaurar. Esto se debe a la estructura cerrada de la CB, que también conduce a una disminución en la permeabilidad al aire. Este estudio sugiere que la CB mejora la calidad del papel deteriorado, sin alterar la información que contiene, y que esta mejora se mantiene a lo largo del tiempo. Por tanto, la CB puede ser utilizada como material de refuerzo para laminar, pudiendo ser más adecuada que el PJ para ciertos tipos de papeles.

El otro método de restauración que se estudió fue la generación *in situ* de la CB sobre el papel a restaurar. Para ello se seleccionó el medio de cultivo sin etanol, ya que el descenso de pH que causaba su presencia podría dañar el documento a restaurar. El método de purificación elegido fue un tratamiento térmico (24 horas a 65 °C), menos agresivo para el material a restaurar que el tratamiento alcalino. Se seleccionó la aplicación del medio de cultivo con la bacteria mediante pincel sobre el material a restaurar. Una vez caracterizado el material restaurado, y éste mismo tras sufrir un proceso de envejecimiento acelerado, se concluyó que no hay modificación apreciable en ninguna característica, salvo en la permeabilidad al aire, que disminuye de manera muy evidente con la generación de CB, dando lugar a un material prácticamente impermeable al aire.

En general se puede concluir que ha quedado demostrada la capacidad de la celulosa generada por la bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 para ser utilizada como material de refuerzo en la restauración del patrimonio documental en papel. Asimismo se han desarrollado dos métodos de aplicación, uno *ex situ* y otro *in situ*, para efectuar esta tarea de restauración.

SUMMARY

The preservation of bibliographic and documentary heritage is one of the biggest challenges that libraries and archives around the world have to face. The search for solutions to the problem of degraded paper has historically been focused from two predominant lines of work: the conservation of these documents by the neutralization of acids in them with alkaline agents, and their restoration by lining them with, basically, cellulose from vegetal sources. Until today, the development of biotechnology-based treatments in documentary heritage conservation has been scarce, although the ability of certain bacteria to produce cellulose takes to propose its use in the field of conservation and restoration of paper. The bacterial cellulose (BC) is chemically identical to the plant cellulose, but its macroscopic organization is different. Its unique properties (high degree of crystallinity, durability, strength and biocompatibility), makes it an excellent resource in different fields.

The use of high-quality BC generated by *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 to restore damaged documents and to consolidate those that may be at risk of degradation, has been studied in this thesis, trying to prevent the document destruction, and to get reinforced papers with good mechanical, optical and structural properties. Protocols that allow the implementation of the BC as a reinforcing material were also developed.

First of all, in order to select the culture medium that provides a cellulose suitable for its use in restoration, it has been evaluated the effect that the carbon and nitrogen sources from the culture medium have on the generated BC, keeping the temperature and the initial pH of the medium as fixed parameters, and performing the culture without shaking. The effect of the addition of 1% ethanol to the culture medium on BC properties was also evaluated. The cellulose layers were collected at four different times, characterizing in all of them the culture medium (pH and carbon source consumption), and the BC sheets (pH, dry weight and optical and mechanical properties). The best combination of carbon and nitrogen sources proved to be fructose plus yeast extract and corn steep liquor, with or without ethanol, which provided a good balance between the

cellulose production and the consumption of carbon source, and generating BC sheets homogeneous and resistant. The addition of ethanol to the culture medium increased productivity but caused a noticeable decrement in pH.

The BC layers generated with these optimized culture media, have been characterized in terms of tear and burst index, optical properties, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction, infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR), polymerization degree, static and dynamic contact angles, and mercury intrusion porosimetry. Moreover it must be kept in mind that the restored materials should be stable over time. Therefore, the same characterization was performed after subjecting the layers of BC to an accelerated aging process. The results showed that the BC sheets obtained have a high crystallinity index, low internal porosity, good mechanical properties, and high stability over time.

To develop working protocols to use this optimized BC in paper restoration, the first step was to select the samples to restore. Three types of model papers, made from mechanical pulp, chemical pulp and filter paper (before and after an accelerated aging process), and three old books purchased in the second hand market, were chosen. These specimens to be restored were also characterized in terms of its mechanical and physicochemical properties.

The first protocol of restoration with BC to be evaluated is called lining. It consists on applying a reinforcing material to the document using an adhesive. The BC produced in the optimized culture medium with 1% ethanol was selected. An alkali purification method (1 hour at 90 °C in 1% NaOH) was applied, and wheat starch was selected as adhesive. The lining process was also carried out with Japanese paper (JP), a material commonly used in conservation, in order to compare both materials. It was concluded that there are no significant differences in the characteristics studied of the two types of reinforcing materials. The reinforced materials were characterized before and after undergoing to an accelerated aging. Papers lined with BC showed more marked differences in the optical properties that papers restored with JP. However, the text was more readable when BC was the reinforcing material. Wettability decreased with both types of reinforcement, although in the papers lined with BC it happened more marked and independently of the sample to restore. This is due to the closed structure of BC,

which also leads to a decrement in air permeance. This study suggests that BC improves the deteriorated paper quality, without altering the information on it, and that this improvement is maintained over time. Therefore, the BC may be used as reinforcing material for lining, being more suitable than the JP to restore certain types of papers.

The other restoration method to be evaluated was the *in situ* generation of BC over the paper to restore. For this purpose the culture medium without ethanol was selected, as the pH decrement caused by his presence would damage the document to restore. As purification method a heat treatment (24 hours at 65 °C) was chosen, less aggressive to the material to restore than the alkaline treatment. It was decided to apply the culture medium with the bacteria onto the material to restore with a brush. The reinforced material was characterized before and after an accelerated aging process. It was concluded that there was no substantial change in any characteristic, except for air permeance, which decreases very sharply after the generation of BC, getting a substantially air impermeable material.

In general, it can be concluded that the ability of BC produced by *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 for its use as a reinforcing material in the restoration of paper documentary heritage, has been demonstrated. Also, two restoration methods, one *ex situ* and another *in situ* have been developed.

I.- INTRODUCCIÓN

“Pocos acontecimientos hay que no dejan al menos una huella escrita. Casi todo, en un momento u otro, pasa por una hoja de papel, una página de cuaderno, una hoja de agenda o no importa qué otro soporte de fortuna, sobre el que se inscriben, a velocidad variable y según técnicas diferentes en cada lugar, hora y humor, los más diversos componentes de la vida ordinaria.”

Especies de espacios – Georges Perec

El Códice calixtino. La Iliada. Hamlet. La teoría de la relatividad. Los planos de la casa Milà. El descubrimiento del bosón de Higgs... El hombre necesita comunicarse y preservar su pensamiento a lo largo del tiempo y del espacio. Después de la expresión oral, es en la escritura donde hemos encontrado nuestro principal instrumento de comunicación. El papel es el soporte fundamental donde guardar y divulgar nuestra historia, debido a sus buenas propiedades: es barato, ligero, fácil de obtener... Sin embargo, gran parte de este soporte está desapareciendo, ya que es un material frágil que puede deteriorarse con el tiempo y los factores ambientales. Las causas de este deterioro pueden ser (Sánchez, 1999):

- Endógenas, relacionadas con las materias empleadas en su fabricación, su forma física y las técnicas seguidas para su acabado (encolados, tintas...).
- Exógenas, causadas por el ambiente que rodea al objeto y la forma en la que es manipulado: la humedad, el calor, los seres vivos, etc.

El mayor potencial de la destrucción viene dado por el efecto sinérgico de diferentes causas (Morrow, 1983), cuyas consecuencias pueden ser (Sánchez, 1999):

- Físicas: pérdida de resistencia, soporte quebradizo, pérdida de grafía, roturas, daños superficiales, deformaciones, arrugas...
- Químicas: hidrólisis ácida, alcalina y enzimática, oxidación, descomposición térmica...
- De percepción: pérdida de legibilidad, cambios de color en el soporte, virajes en los pigmentos...

Todas estas consecuencias se traducen en un riesgo para la integridad del soporte y su contenido, limitan su uso y finalmente provocan su destrucción.

1.- UN POCO DE HISTORIA

1.1.- Comenzando por el principio

El soporte en el que guardamos nuestra historia ha ido evolucionando con el paso del tiempo. En el Antiguo Egipto se utilizaba el papiro, obtenido a partir de una planta muy abundante en las riberas del río Nilo, *Cyperus papyrus*. Se cortaban tiras largas y delgadas de la médula del tallo y se colocaban una al lado de otra formando una capa. Colocando encima de esta capa otra perpendicular se obtenía una hoja que se prensaba, se secaba y se frotaba con una concha o una pieza de marfil para darle más suavidad a su textura (figura 1a). Fue utilizado durante mucho tiempo, pero su uso terminó con la invasión árabe y, también en gran medida, por la competencia con el pergamino (figura 1b), de mayor resistencia y durabilidad, que se utilizaba desde el año 1500 a.C. Consiste este último en pieles de animal sin curtir, sin pelo, limpias, maceradas en cal y satinadas. Debe su nombre a la ciudad de Pérgamo, en Asia Menor, donde artesanos especializados lograron darle una alta calidad. Fue un soporte de gran prestigio durante toda la Edad Media (Sánchez, 1999).

a)



b)



Figura 1. a) Papiro de Ebers. 1550 a.C.; b) Pergamino Codex Runicus. 1300 d.C.

Se considera que el papel, tal como lo entendemos hoy, fue inventado en China (Vergara, 2002). En sus comienzos la producción artesanal de papel se realizaba a partir de residuos de seda, paja y cáñamo. El primer proceso de fabricación de papel fue el desarrollado por Ts'ai Lun en la corte del emperador hacia el 105 d.C. Su innovación consistía en la desintegración de las fibras vegetales y trapos con un mazo pesado de madera. Como materia cohesiva para unir las fibras y dar la impermeabilidad necesaria se utilizaba un extracto de agar, alga marina que ya se utilizaba con fines medicinales (Asenjo e Hidalgo, El papel: 2.000 años de historia).

Durante unos 500 años, la fabricación de papel estuvo limitada a China, pero en el año 610 se introdujo en Japón. En el año 751 el gobernador militar del califato de Bagdad capturó a dos fabricantes chinos de papel en la batalla de Samarkanda, haciéndose así con el conocimiento necesario para su fabricación. Los avances introducidos por los árabes fueron: el blanqueo de las fibras con cal, y el encolado con goma arábiga o engrudo de almidón. Las materias primas utilizadas eran algodón, lino y cáñamo. Los árabes, a su vez, llevaron este conocimiento a Europa, entre cuyas fábricas más antiguas conocidas figura la de Játiva (1154, primer molino documentado en Europa). Se supone que pudo haber otras en ciudades como Córdoba, Sevilla o Toledo (Asenjo e Hidalgo, El papel: 2.000 años de historia). En la figura 2 se puede observar la fabricación de un papel de manera artesanal.

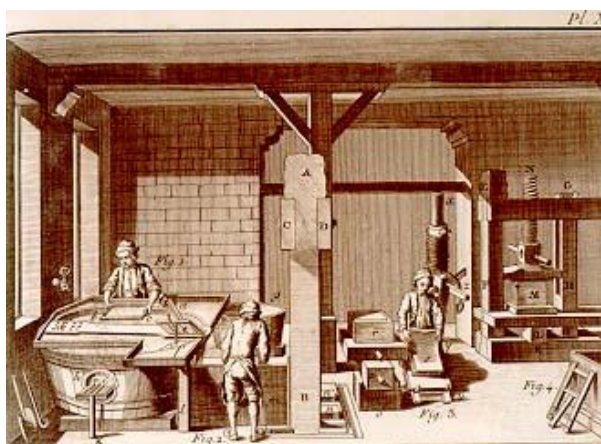


Figura 2. Fabricación artesanal de papel.

1.2.- Papeles de trapos

Toma ejemplo del papel,
Que se hace de trapos viejos
Y sube hasta los consejos
Y a que escriba el rey en él.
¿Quién hay que aliento no cobre
Viendo el papel que ha subido
A escribirle al rey, si ha sido
Una camisa de pobre?.

Lope de Vega (1562-1635)

Puesto que también los trapos estaban hechos de algodón, lino y cáñamo, se comenzaron a utilizar como materia prima para fabricar papel. La primera referencia sobre producción del papel en Italia es de 1276, en el pueblo de Fabriano, donde se introdujo el papel de trapo satinado tratado con una cola de gelatina animal (Vergara, 2002). Esta técnica de encolado fue muy bien recibida, ya que permitía a las agudas plumas de ave trazar sin rasgar la superficie del papel, y que la tinta no penetrara en las fibras absorbiéndose como un secante.

Con el paso del tiempo las técnicas papeleras se extendieron a otros países europeos. Se perfeccionaron las técnicas del encolado y se mejoraron las máquinas, hitos que significaron la masificación de su uso. Era tan beneficioso que los mercaderes italianos lo dieron a conocer por todas sus rutas hasta que el pergamino fue siendo desplazado por el papel.

Para obtener papel primero hay que tener las fibras separadas. Para ello se cortaban los trapos en tiras y se golpeaban con pesados mazos mientras una corriente de agua limpiaba las impurezas (Crespo y Viñas, 1984). Se mezclaban bien las fibras de la pasta resultante, se recogía esta pasta en un tamiz y, una vez escurrida, se cubría con paños de fieltro, se prensaba y se secaba. Este proceso manual había que hacerlo hoja a

hoja. Como tenía poco color apenas se necesitaba blanquear, aunque a veces se podía hacer un ligero blanqueo junto con la desintegración, poniendo en remojo los trapos con cenizas alcalinas (carbonatos, potasa...). En algunas ocasiones las hojas se secaban al sol, produciéndose un blanqueo por efecto de la radiación ultravioleta, pero sin consecuencias demasiado perjudiciales para el papel.

En el siglo XV, con la creación de la imprenta por Guttenberg (1455), se empieza a utilizar el encolado de manera generalizada. En los siglos XVI-XVII se introduce el uso de alúmina, que disminuye el crecimiento bacteriano e incrementa la fijación de la gelatina.

Con el progreso industrial a comienzos del siglo XVIII y la ilustración, la demanda de papel llevó al uso de cualquier trapo, deteriorado o no, e incluso al saqueo de cementerios para reutilizar los sudarios como materia prima, siendo necesaria en este caso una etapa de blanqueo. La demanda de papel seguía superando a la oferta, así que empezó a surgir la necesidad de una nueva materia prima. La respuesta a esta necesidad la dió un entomólogo el 15 de noviembre de 1719. René Antoine Ferchault de Réaumur presentó en la Academia de Ciencias de París una comunicación que tituló *Historia de las avispas*, en la que se describía cómo éstas hacen una materia muy similar al cartón masticando madera para hacer sus colmenas. Esto no pasó desapercibido a los científicos y entre 1765 y 1771 Christian Schäffer, famoso botánico, entomólogo y micólogo alemán, publicó una obra en seis volúmenes en la que se reunían sus experimentos y más de 50 tipos de papel realizados con diversos materiales: asbesto, nidos de avispa, patata, cáñamo, malvavisco, enea, cardos y otras plantas (Keim, 1966).

En 1799 Robert fabrica la primera máquina de papel de hoja continua, que fue diseñada por Fourdrinier y patentada en 1807 (figura 3) (Smook, 1990). La escasez de trapos para hacer papel a mediados del siglo XIX se resolvió en Gran Bretaña con la introducción del esparto como materia prima. La primera patente para fabricar papel y cartón con esparto se registró en Inglaterra en 1839. Varios fabricantes de papel experimentaron con métodos específicos para obtener pasta papelera, pero sería finalmente Thomas Routledge quien conseguiría papel industrial de esparto a escala comercial. Utilizó esparto español y africano. Debido a la fuerte demanda y a los costes del transporte, el precio aumentó en gran medida (Grant, 1959).

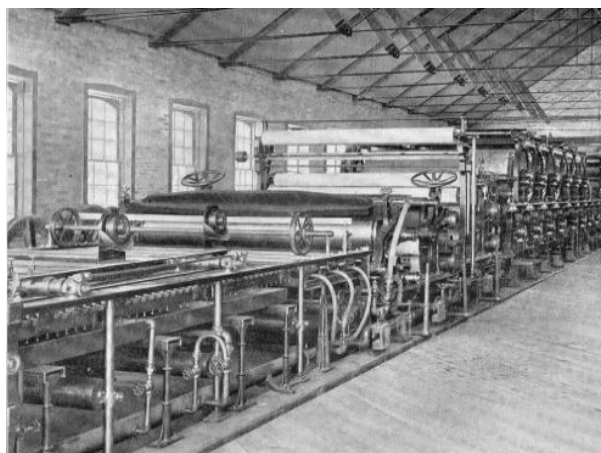


Figura 3. Máquina de papel Fourdrinier.

Con el aumento de la producción de papel, la cola animal empezó a ser escasa y cara. Moritz Illig descubre hacia 1806 el encolado en masa con resinas de colofonia, que debía llevarse a cabo a pH ácido para que dichas resinas se desprotonaran (Keim, 1966). Por otro lado, el blanqueo con cenizas era lento y poco efectivo. Desde el descubrimiento del cloro por Scheele en 1777, el dióxido de cloro y otros productos químicos empezaron a ser utilizados en la industria del papel de forma masiva, pese al debilitamiento que producen por oxidación en las fibras papeleras.

A mediados del siglo XIX, Payen abre las puertas a la fabricación de pastas papeleras basadas en la madera. Payen descubrió que, después de la purificación de ciertos tejidos vegetales con un tratamiento ácido y amoníaco, seguido de extracción con agua, alcohol y éter, permanecía un material fibroso. Determinó, mediante análisis elemental, que su fórmula era $C_6H_{10}O_5$, la celulosa (Sánchez, 2012).

1.3.- El uso de la madera

En 1840 Friedrich Köller patentó una máquina capaz de desfibrar mecánicamente la madera y fabricar pasta aplicando solamente tratamientos físicos, que empezó a ser utilizada de forma masiva para la producción de pasta de papel a partir de la década de

los 50. La economía del proceso y la posibilidad de disponer de grandes cantidades de materia prima desplazó a los trapos tradicionales y se generalizó el nuevo soporte. En la década de 1860, la producción de pasta de papel a partir de madera se convirtió en comercialmente viable, particularmente en Norteamérica y los países nórdicos, posibilitando el verdadero despegue de la moderna industria papelera occidental. Los procesos de pasteado de este tipo se denominan *procesos mecánicos* y la pasta así obtenida se denomina *pasta mecánica*. Además del cambio en la materia prima para obtener la pasta, se extiende el uso de resina de colofonia como agente encolante entre 1840 y 1850. La alúmina natural se sustituye por la sintética, sulfato de aluminio, a finales del siglo XIX.

Posteriormente, en 1851, Hugh Burgess y Charles Watt, idearon una técnica para disolver la lignina y dejar la celulosa más accesible, cociendo la madera en sosa cáustica a altas temperaturas, tratamiento industrial conocido con el nombre de *proceso a la sosa* que, aunque permitía imprimir, causaba una enorme degradación de la celulosa. Seis años más tarde, Tilghman descubrió que la lignina se disolvía a temperaturas y presiones altas con ácido sulfuroso y bisulfito de calcio. Poco tiempo después, en 1884 el alemán Karl Dahl ideó el proceso al sulfato, consistente en el tratamiento de las astillas de madera en una lejía de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio, que se producía por reducción del sulfato de sodio, un reactivo barato que da nombre al proceso. La pasta al sulfato proporcionaba papeles de elevada resistencia y buena permanencia.

Por otra parte el encolado ácido no permite el uso de carbonato de calcio como carga, más económico que el caolín utilizado. Se trató entonces de acercar el pH a la neutralidad, empleando policloruro de aluminio (PAC) en lugar de alúmina. Además con los años se evolucionó hacia resinas modificadas para permitir encolados neutros o alcalinos. A partir de 1950 se comienzan a usar resinas sintéticas, como los dímeros de aquil cetona (AKD) o el anhídrido succínico alqueno (ASA), que permiten encolar a pH neutro y, por tanto, utilizar el carbonato de calcio como carga. Se van implantando sobre todo para pastas químicas (años 70 en Europa y 80 en Norteamérica) y algo después para pastas mecánicas. Por tanto a partir de esa fecha el problema de la acidez afecta en menor medida.

2.- LA DESAPARICIÓN DEL PATRIMONIO

2.1.- El descubrimiento del desastre

A comienzos del siglo XIX empezaron a verse las consecuencias de la mala calidad de los documentos archivados. Así, en 1823 el inglés John Murray describió el problema de la desaparición del patrimonio escrito a causa del deterioro químico. Él fue el responsable de la noticia aparecida en *The Gentleman's Magazine* en la que se acusaba a los fabricantes de blanquear la pasta de papel con cloro y adulterarla después con sulfato de calcio. El resultado, a juicio del autor, era un papel que, literalmente, “se deshacía en polvo”. Posteriormente, en 1829, publicó un extenso estudio en el que describía con detalle el deterioro químico (Princi, 2011).

En 1843 Michael Faraday mostró volúmenes encuadernados en cuero en un estado terrible de deterioro durante una conferencia en la Royal Institution de Londres. Faraday atribuyó este mal estado a la influencia del ácido sulfúrico en la degradación del cuero y el papel (Hofenk de Graaff, 1999). Más tarde, en 1845, el holandés Van der Boon Mesch se quejaba de la disminución de la calidad del papel documental y llevó a cabo una investigación sobre su durabilidad. Él señalaba que la introducción de nuevas máquinas y nuevos métodos de blanqueo hacía disminuir dicha durabilidad (Princi, 2011). Años más tarde, en 1876, Anselme Payen declaró que los restos de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico en la pasta ejercerían una acción destructiva con el tiempo (Sánchez, 2012). William Blades, bibliógrafo e impresor inglés, pasó a la historia por la obra *The enemies of books* que, publicada por primera vez en 1880, es uno de los primeros ensayos sobre los problemas de conservación del patrimonio documental. En el capítulo VIII describe los catastróficos efectos que tenían en las fibras de papel el ácido clorhídrico, la sosa o el ácido oxálico, utilizados para blanquear las hojas de papel o eliminar manchas de grasa y tintas (Sánchez, 2012).

En 1897 el Comité en el Deterioro del Papel, nombrado por la Sociedad de las Artes de Londres, realizó una investigación sobre este tema, si bien en ella se concluyó, en un informe fechado en 1898, que el peligro había sido sobreestimado. Otra de las

causas del deterioro del papel era el problema de la corrosión de la tinta ferrogálica, que aparece reflejado en una conferencia internacional en St. Gallen, Suiza, en 1899.

De estos datos históricos podemos deducir que en el siglo XIX ya se tenía conocimiento de la influencia de dos factores distintos, uno externo y otro interno, de deterioro del papel. El factor interno se debía a la producción del papel (encolantes, blanqueantes...), y el externo a la contaminación ambiental y a los efectos negativos de ciertas tintas (Hofenk de Graaff, 1999). Sin embargo, las bibliotecas y archivos no fueron plenamente conscientes de la gravedad del problema hasta que, en 1959, bajo los auspicios de la Virginia State Library, William Barrow (figura 4) calculó que más del 90% de la literatura científica publicada en los EEUU se habría destruido a finales de siglo XX (Barrow, 1959). Aunque su previsión fue exagerada, sirvió para poner de manifiesto la importancia del problema de la degradación del papel.

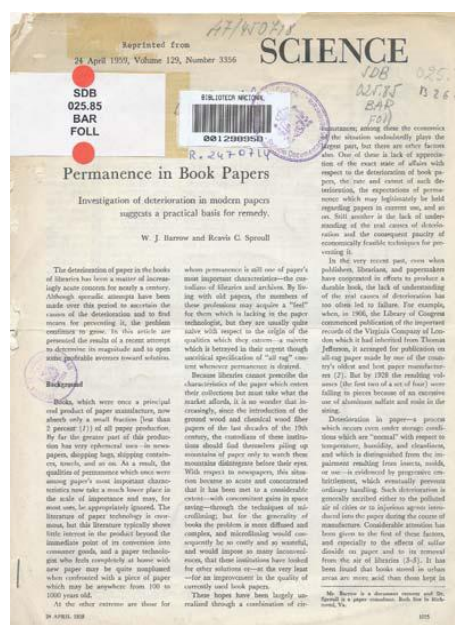


Figura 4. William J. Barrow. *Permanence in book papers: investigation of deterioration in modern papers suggest a practical basis for remedy* [s.l.:s.n., 1959].

En ese momento bibliotecas de todo el mundo revisaron sus fondos y descubrieron un hecho sorprendente: Papeles fabricados desde mediados del siglo XIX a mediados del siglo XX, especialmente entre 1860 y 1960, presentaban una elevada

degradación, mientras que papeles de siglos anteriores mostraban gran estabilidad química y apenas degradación por hidrólisis u oxidación (Sánchez, 2012). La explicación a este hecho radica en el proceso de fabricación del papel y los aditivos utilizados para ello. Como ya se ha explicado, el papel se elaboraba desde finales de la Edad Media hasta el siglo XIX con trapos de celulosa cristalina de alta calidad y con poco color (apenas hacía falta blanquear). Sin embargo, a partir de mediados del siglo XIX los papeles estaban fabricados con madera mediante pasteado mecánico y utilizando encolado ácido. Recordemos que en los papeles procedentes de pasteado mecánico se conserva toda la lignina de la madera, un polímero heterogéneo constituido por unidades de fenil propano que se degrada por la acción del entorno (radiación ultravioleta, calor,...) produciendo radicales y generando grupos ácidos. La rotura de los enlaces de la cadena de celulosa (hidrólisis) se favorece en medio ácido, causando una degradación paulatina que finaliza con la desintegración del papel. El efecto visible de este proceso es que el papel amarillea, se vuelve frágil y acaba por desmenuzarse, con lo que la permanencia de estos papeles es notablemente inferior al de los papeles realizados a base de trapos, celulosa casi pura.

Así pues, la desaparición del patrimonio bibliográfico y documental de estos años (1860-1960), es uno de los mayores problemas a los que se enfrentan bibliotecas y archivos de todo el mundo (Baty *et al.*, 2010). Según estudios de la Biblioteca Británica y de la Biblioteca Nacional de Francia, más del 96% de sus colecciones presenta pH ácidos y el 50% contiene pasta mecánica (Wätcher, 1989). Se calculó que en 1987 las colecciones de investigación en las bibliotecas norteamericanas constaban de unos 300 millones de volúmenes. Entre el 10 y el 50% de ellos se encontraban en estado quebradizo, lo que suponía unos 90 millones de libros que no podían ser utilizados por su fragilidad (Smith, 1987). Las evaluaciones europeas son similares: de los 100 millones de volúmenes conservados en las seis mayores bibliotecas de la antigua RFA, unos 12 millones estaban fuera de uso en 1989 (Schwederdt, 1989) y estudios realizados en Bélgica, Holanda y Suecia dieron resultados casi idénticos (Lienardy *et al.*, 1994).

La situación en Norteamérica es parecida, según Hon (1989), de los 20 millones de libros de la Biblioteca del Congreso de Norteamérica aproximadamente el 30% se encuentra en un estado tan crítico de conservación que no pueden circular, y en la

Biblioteca Pública de Nueva York, cerca del 50% de sus más de cinco millones de libros está en un estado muy defectuoso.

El impacto de la alteración en la depreciación cultural y económica de las bibliotecas es mensurable. Un estudio sobre el estado de conservación de 20 ejemplares de la misma edición depositados en tres bibliotecas diferentes, evidenció la velocidad con la que estos procesos se producen (Smith, 1972). La comparación de resultados demostró que la vida media se reducía a la mitad según la biblioteca estudiada. Se estableció que en las condiciones normales de una biblioteca urbana, la vida media de los ejemplares realizados en pasta mecánica se reducía a razón de un 57% cada quince años. En un trabajo posterior (Smith, 1987), se valoraba el porcentaje de alteración en un 4,7% anual, lo que suponía que, si la Biblioteca del Congreso almacenaba en 1987 14 millones de libros con un valor aproximado de 1.400 millones de \$, la depreciación de las colecciones se acercaría a 65,3 millones de \$ anuales o, lo que es lo mismo, cerca de 150.000 € al día.

2.2.- Soluciones actuales

La desacidificación es la principal línea de trabajo en la que se han centrado las tareas de restauración desde principios de los años 70. Consiste fundamentalmente en neutralizar los ácidos presentes en el papel mediante el tratamiento con agentes alcalinos (carbonato de calcio, carbonato de magnesio, tetraborato de sodio, hidróxido de bario...), creando además una reserva alcalina capaz de amortiguar o de inhibir futuros ataques ácidos. A efectos prácticos se consigue alargar la esperanza de vida de los papeles tratados de cuatro a cinco veces, y ralentizar la degradación del papel, aunque no pararla, con lo que es necesario encontrar otras alternativas para la consolidación de los soportes deteriorados. Por otra parte, la desacidificación no permite ni la restauración de los documentos muy dañados o rotos, ni recuperar la flexibilidad y resistencia del papel degradado, con lo que es necesario realizar tratamientos adicionales como la laminación manual, en seco, interna o el reapresto (tabla 1).

Tratamiento	Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Laminación manual	Adhesión de una lámina de papel japonés por una o dos caras del soporte con almidón, gelatina o éteres de celulosa.	Reversibilidad. Posibilidad de utilizar soportes suplementarios diversos. Poco agresivo.	Alto coste. Modificación del aspecto de la obra. Inviabile en grandes cantidades de documentos. Puede afectar a las tintas.
Laminación en seco	Adhesión de una lámina de papel japonés con adhesivos termofundentes (ej. acrilatos, polietileno)	Rapidez. Posibilidad de mecanización y tratamiento semiindustrial.	Alto coste. Modificación del aspecto de la obra, especialmente por la cara laminada. Irreversible.
Laminación interna del papel o "Splitting"	Las dos caras del documento son separadas para proceder al refuerzo interior con papel japonés y un adhesivo termoplástico.	Aparentemente, el documento no sufre modificaciones. Muy efectivo	Destrucción del documento original por la división de sus dos caras. La unión no siempre es perfecta. Aumento de grosor. Irreversibilidad.
Consolidación o reapresto	Aplicación superficial de adhesivos en baja concentración.	Posibilidad de utilizar un amplio abanico de sustancias. En papel antiguo, buenos resultados.	En papel moderno resultados inapreciables. Modificación de las propiedades químicas del documento. Posible desarrollo de reacciones químicas indeseadas. Irreversibilidad.

Tabla 1. Principales tratamientos para la recuperación física del papel quebradizo (cortesía de Arsenio Sánchez Hernampérez).

La consolidación o reapresto con gelatina o almidón permite la mejora de la resistencia del papel por el incremento de la cohesión interfibrilar. Los efectos son notables en papeles con fibras de calidad, como algodón, lino y cáñamo, pero son reducidos cuando se trata de papeles dañados por microorganismos o formados por

pastas mecánicas de madera, especialmente cuando las fibras están severamente hidrolizadas.

La aplicación de una lámina de refuerzo al documento dañado es uno de los tratamientos de restauración más frecuentes. Este método se denomina “laminación”, siendo su aplicación manual el proceso más ampliamente extendido. El material más utilizado para reforzar papeles degradados mediante laminación es el conocido como “papel japonés”, también llamado “washi paper”. Está hecho con fibras largas de kozo, gampi o mitsumata, tres plantas japonesas típicas que proporcionan gran resistencia con un gramaje muy bajo. La aplicación de este material de refuerzo al material a restaurar se efectúa con la ayuda de un adhesivo, como puede ser el almidón de trigo o la gelatina.

Ninguno de los procesos de consolidación es completamente satisfactorio para todos los papeles a restaurar, bien porque modifique el aspecto del documento al que refuerza, bien porque aumente el grosor del mismo, o, incluso, porque modifique sus propiedades químicas.

2.3.- La alternativa

En los últimos años se han desarrollado tratamientos biotecnológicos para la limpieza o consolidación de piedra (Dhami *et al.*, 2014; Jroundi, 2010). Sin embargo no ha habido apenas estudios dedicados a la aplicación de la biotecnología en el campo del patrimonio documental. Un grupo investigador español publicó un método enzimático para consolidar fibras de papel basándose en estudios previos sobre síntesis *in vitro* de celulosa con celulasas en condiciones tales que permiten revertir su acción, es decir, reconstruir las cadenas de celulosa (de Lera *et al.*, 2009). Sin embargo el mecanismo es sumamente delicado ya que un leve cambio en las condiciones de tratamiento puede hacer que la celulasa recupere su condición hidrolítica y, en nuestro caso, destruya un soporte de incalculable valor.

La capacidad de la bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* de producir celulosa de alta calidad es ampliamente conocida, fue descrita por primera vez por Brown en 1886. Esta celulosa tiene propiedades únicas, resultado de una estructura reticulada

ultrafina: es químicamente pura (llegando a valores de un 98% de celulosa), tiene un elevado grado de cristalinidad, alta resistencia mecánica, elasticidad y durabilidad, es compatible con la celulosa vegetal, proporciona un papel más fuerte (Ross *et al.*, 1991) y permite la fabricación de papel sobre algunos materiales fibrosos (Pommet *et al.*, 2008). Todas estas características hacen de la celulosa bacteriana el candidato perfecto, tanto para restaurar papeles deteriorados, como para efectuar labores de conservación en cualquier tipo de documento a preservar. Se plantea en esta tesis su posible uso en el campo de la restauración de dos maneras diferentes. Por un lado láminas de celulosa bacteriana pueden ser utilizadas en el proceso de laminación suponiendo una alternativa al papel japonés. Otra posible manera de utilizar la celulosa bacteriana sería mediante su generación *in situ*, es decir, formándose directamente sobre el papel a restaurar. En este último caso se generarían nuevos enlaces entre las cadenas de celulosa, rotas o dañadas, aportando resistencia, flexibilidad y, además, con las mismas características del material a restaurar.

3.- LA CELULOSA

3.1.- Fuentes de celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra, representando una fracción mayor de la biosfera que todos los demás biopolímeros juntos (Matthews *et al.*, 2006). La fuente más habitual de celulosa es el mundo vegetal: las plantas, los pelos de ciertas semillas, incluso plantas marinas, turba... Pero también ciertos microorganismos son capaces de sintetizar celulosa, incluyendo bacterias (*Acetobacter*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*), algas y hongos (Bielecki *et al.*, 2005).

3.2.- Celulosa vegetal

3.2.1.- Composición química de la madera

La más importante fuente de celulosa es la madera, término que engloba al conjunto de tronco, raíces y ramas de los árboles y arbustos una vez eliminada la

corteza. Tanto en la estructura de la madera de las especies frondosas como en la de especies coníferas, destaca la existencia de un tipo celular, las traqueidas o fibras, que sirven de sostén a la planta. Por lo general las fibras de las coníferas son de mayor tamaño, tal y como se refleja en la tabla 2, y, además de la ya mencionada función estructural, ejercen una función de transporte de savia. La estructura de las fibras es muy similar en ambos casos, como lo es también la estructura de las fibras presentes en otros materiales lignocelulósicos.

	Coníferas	Frondosas
Longitud de fibra (mm)	2,5-3,5	1,1-1,5
Ancho de fibra (µm)	5-40	19-28
Espesor de pared (µm)	3,8-5,2	3,2-4,9

Tabla 2.- Tamaños habituales de fibras de frondosas y coníferas (Aitken *et al.*, 1988).

La constitución química de la madera es compleja y presenta importantes variaciones dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento. En términos generales, y respecto a peso seco, se pueden dar los siguientes porcentajes (Aitken *et al.*, 1988):

- Componentes minoritarios: 2-10% en total. Taninos, aceites volátiles, resinas, ácidos grasos, gomas, látex, alcaloides...
- Lignina: 15-35%
- Hemicelulosas: 20-35%
- Celulosa: 40-50%

La palabra lignina deriva del latín *lignum*, madera. Es una macromolécula tridimensional aromática, resultado de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos

(coniferílico, cumárico y sinapílico). El acoplamiento aleatorio de estos radicales origina un polímero amorfo. La lignina funciona como un pegamento que fija la estructura de la madera (Sjöström, 1993). La figura 5 muestra la estructura química de la lignina.

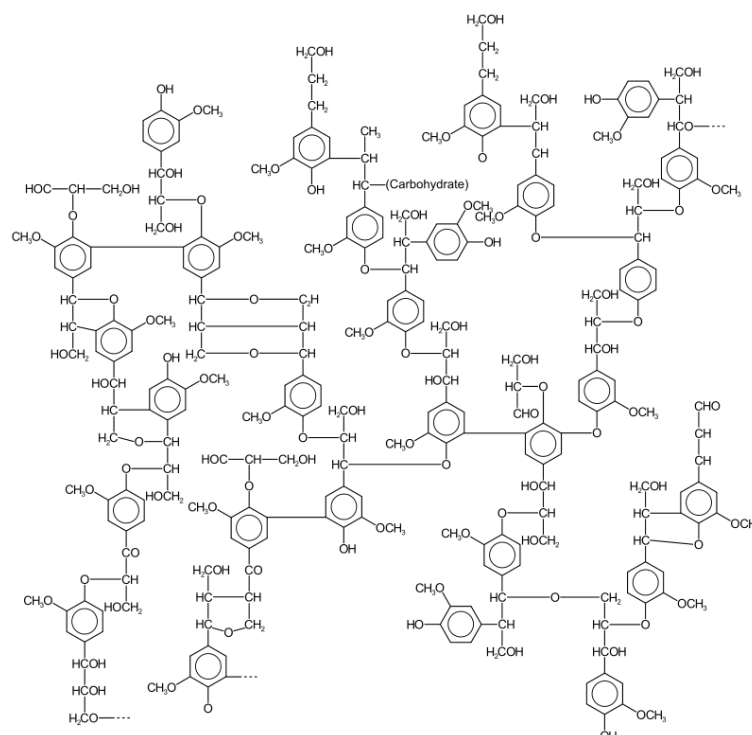


Figura 5. Estructura química de la lignina (Glazer *et al.*, 1995).

Hemicelulosa es un nombre común para un gran número de diferentes heteropolímeros de hidratos de carbono, de los cuales xilanos y glucomananos son los componentes principales. Las hemicelulosas están más estrechamente asociadas con la lignina que la celulosa, y su estructura es amorfa debido a la presencia de muchas cadenas laterales, que impiden la estrecha asociación entre las moléculas necesaria para la formación de regiones cristalinas (Klemm *et al.*, 1998). La estructura química de las hemicelulosas tipo xilano se muestra en la figura 6.

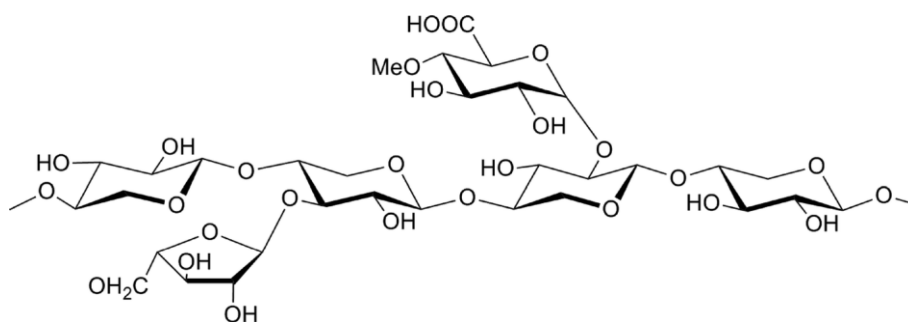


Figura 6. Estructura química de la hemicelulosa tipo xilano (Chen *et al.*, 2014).

La celulosa es el constituyente principal de la pared celular vegetal. Es renovable, biodegradable y biocompatible. Se estructura de manera homogénea y regular, como una cadena lineal de entre 2.000 a 14.000 moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos del tipo β (1 \rightarrow 4). Una molécula de glucosa se une a su adyacente, eliminando una molécula de agua entre los grupos hidroxilo del C1 de la primera y del C4 de la segunda, formando la celobiosa. La unión de varias celobiosas conforma una molécula de celulosa (figura 7). Su fórmula química es $(C_6H_{10}O_5)_n$.

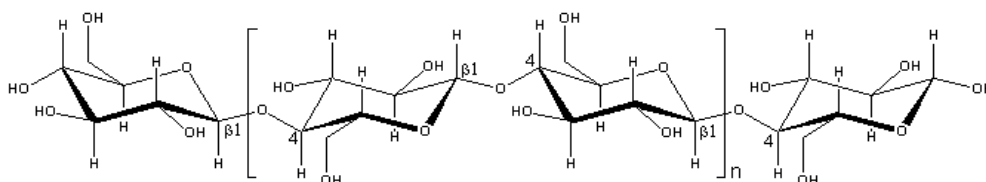


Figura 7. Cadena β (1 \rightarrow 4) glucano que constituye la celulosa (Brown *et al.*, 1996).

Estos enlaces β (1 \rightarrow 4) son los que hacen que la molécula sea rectilínea, permitiendo la formación de dos enlaces de hidrógeno intramoleculares dentro de cada residuo de glucosa (figura 8): un enlace une el O(2) al O(6) del siguiente residuo, y el otro enlace une el O(5) al O(3). El patrón de enlaces por puente de hidrógeno intermolecular une las diferentes cadenas de celulosa, O(3) al O(6).

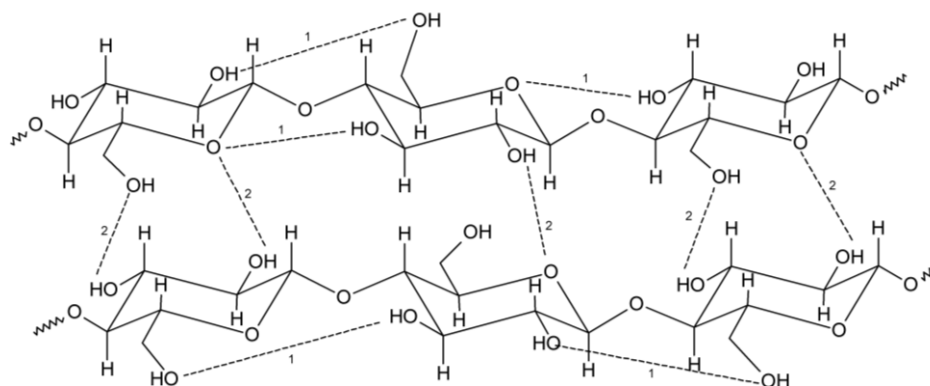


Figura 8. Representación de los enlaces por puente de hidrógeno intra (1) e inter (2) moleculares (Festucci-Buselli *et al.*, 2007).

El denominado grado de polimerización especifica el número de monómeros de glucosa que constituyen la molécula lineal. Dependiendo del tipo de celulosa estudiada, este parámetro puede variar desde las 15000 unidades para algunas fibras de algodón hasta valores cercanos a 50 para ciertas celulosas microcristalinas.

La celulosa vegetal posee regiones con un alto ordenamiento (cristalinas) y regiones donde ese ordenamiento es bajo (amorfos). En las zonas cristalinas, difícilmente accesibles a los reactivos, las cadenas de celulosa se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y otras fuerzas más débiles de Van der Waals. En las regiones amorfas la disposición de las moléculas es desordenada, y la unión entre las cadenas es menor que en las regiones cristalinas. La fracción amorfa es la más accesible al agua y a los agentes químicos, siendo por tal razón la más reactiva.

Para caracterizar cuantitativamente la proporción de zonas cristalinas en una celulosa se utiliza el “índice de cristalinidad”, (Retegi *et al.*, 2010). La celulosa puede tener seis diferentes estructuras cristalinas (I, II, III_I, III_{II}, IV_I y IV_{II}) que pueden ser convertidas unas en otras (O’Sullivan, 1997), como muestra la figura 9.

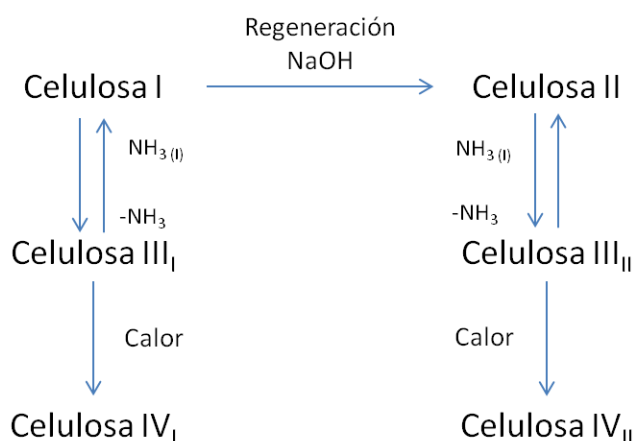


Figura 9. Interconversión de los polimorfismos de la celulosa (O'Sullivan, 1997).

Las principales características de cada una de estas formas cristalinas son las siguientes:

Celulosa I: Es la celulosa natural o nativa, caracterizada por una disposición paralela de las cadenas de celulosa que forman enlaces por puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals (Wada *et al.*, 2010). Se halla en dos formas cristalinas alomórficas, I α (triclínica) o I β (monoclínica), dependiendo del modo de unión de las cadenas por los enlaces de puentes de hidrógeno, como se aprecia en la figura 10. La celulosa I α es metaestable, se encuentra en la pared celular primaria, con una orientación paralela a la dirección de crecimiento celular y una alta cristalinidad en comparación con la celulosa I β , que se encuentra en la pared secundaria (Kataoka y Kond, 1999). Estas dos formas alotrópicas coexisten en una misma fibrilla en diferentes proporciones dependiendo de su origen. La celulosa producida por microorganismos tiene un mayor componente de la estructura I α , mientras que en la celulosa de origen vegetal predomina la estructura I β (O'Sullivan, 1997).

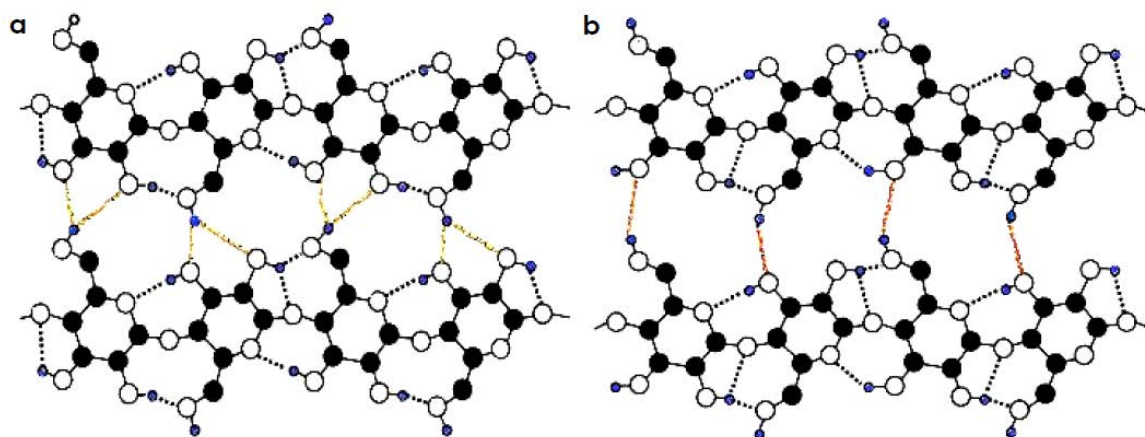


Figura 10. Enlaces de puentes de hidrógeno para la celulosa Ia (a) y Ib (b). ●Carbono ○Oxígeno
●Hidrógeno. La línea de puntos coloreada representa la unión de puente de hidrógeno entre cadenas (Festucci-Buselli *et al.*, 2007).

Celulosa II: Se encuentra de forma natural sólo ocasionalmente. Se obtiene cuando la celulosa nativa se somete a un proceso de mercerización con NaOH (El Oudiani *et al.*, 2011). Posteriormente se regenera y neutraliza con HCl, dando lugar a un poliformismo termodinámicamente más estable. La celulosa II presenta una disposición de cadenas antiparalela.

Celulosa III: Se obtiene mediante el tratamiento de las celulosas I y II con amoníaco y aminas (Ishikawat *et al.*, 1998), dando como resultado las celulosas III_I y III_{II} respectivamente, siendo esta transformación reversible. La disposición de las cadenas permanece paralela en la celulosa III_I, y antiparalela en la celulosa III_{II}, como corresponde a la celulosa I y II.

Celulosa IV: Obtenida a partir de la celulosa III mediante calentamiento a 260°C, dando lugar a las estructuras IV_I y IV_{II} que provienen originalmente de la celulosa I y II respectivamente. Es termodinámicamente estable (Zugenmaier, 2001).

3.2.2.- Ultraestructura de la pared celular

Entre 40 y 100 de las cadenas lineales de celulosa se unen en una fibrilla elemental mediante enlaces de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Un agregado de unas 20 fibrillas elementales constituye una microfibrilla. A su vez, alrededor de 250 de estas microfibrillas se agregan en fibras, que se enrollan helicoidalmente con relación al eje de la célula vegetal, en su pared celular (figura 11).

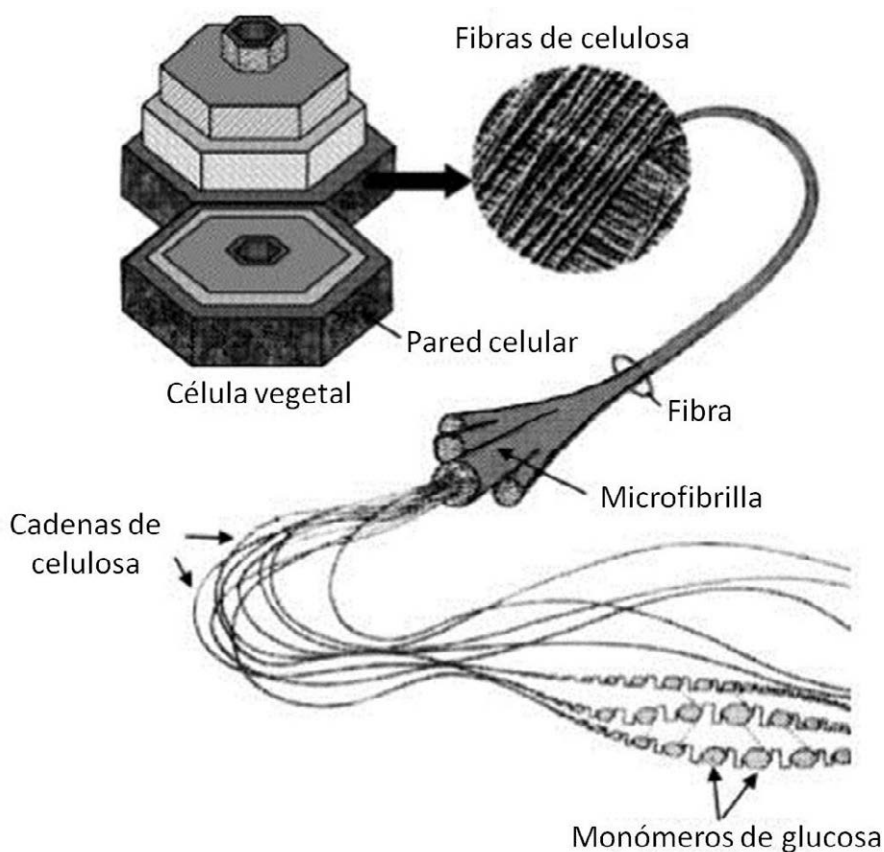


Figura 11. Formación de la pared celular vegetal (Djerbi, 2005).

La pared de las células de la madera está organizada de acuerdo a una estructura en capas, tal y como se puede ver en la figura 12.

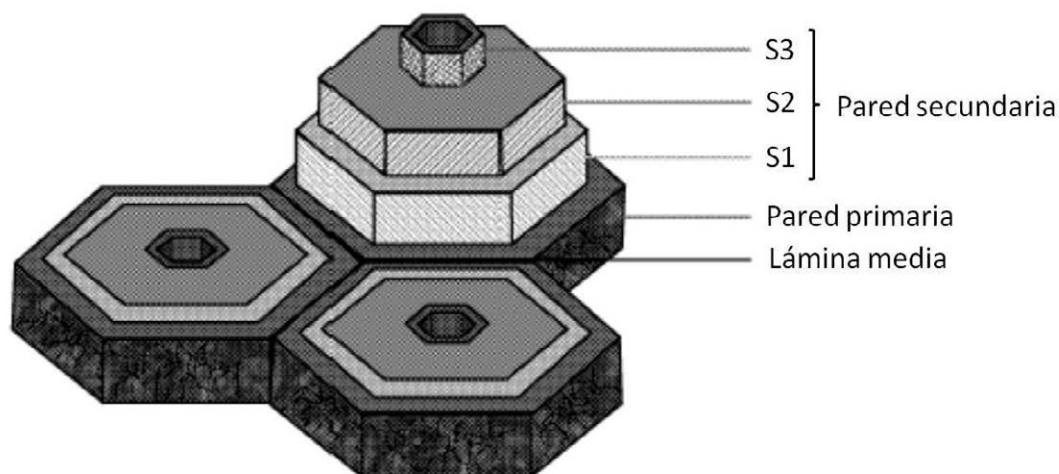


Figura 12. Diagrama de las capas de la pared celular (Djerbi, 2005).

En ella pueden distinguirse, desde fuera hacia adentro, los siguientes elementos (Peraza *et al.*, 1993):

- Lámina media o pared intercelular: Se forma durante la división celular y se sitúa entre células adyacentes. Es la capa más externa, con un espesor que varía entre 0,5 y 2 μm . Formada principalmente por lignina y cantidades mínimas de hemicelulosas. Su presencia se debe a la incrustación de la lignina en la matriz de hemicelulosa, deshidratándola y reduciendo al mínimo el espacio ocupado por ésta. Además de su composición química se distingue de la pared primaria y secundaria en que tiene carácter isotrópico.
- Pared primaria: Se genera como producto de la primera deposición de microfibrillas de celulosa, en forma dispersa y no orientada. Tiene un espesor que varía entre 0,1 y 0,5 μm y su composición aproximada es de mitad celulosa y mitad de lignina. Tiene carácter anisotrópico, estando las microfibrillas altamente anguladas respecto al eje longitudinal de la célula. Su parte celulósica está organizada en forma similar a la pared secundaria.

- Pared secundaria: Se forma durante el engrosamiento de la pared. Constituida principalmente por celulosa con menores incrustaciones de lignina. Su espesor varía entre 1 y 10 μm , dependiendo del tipo celular y de si se trata de madera de primavera o de verano. Comprende a su vez tres capas, S_1 , S_2 y S_3 desde fuera hacia dentro. En cada una de ellas las microfibrillas de celulosa se disponen de forma ordenada en varios planos, de modo que, en cada plano, todas las microfibrillas son paralelas, cambiando la orientación de las fibrillas de un plano al siguiente (Paniagua *et al.*, 1997):
 - **S_1** : capa más externa, disposición helicoidal, casi en el plano perpendicular al eje longitudinal de la célula. Comprende cuatro subcapas, en cada una de ellas la dirección de la hélice cambia de sentido horario a antihorario, formando ángulos de entre 70 y 90°. Su espesor varía entre 0,1 y 0,3 μm y posee el porcentaje de lignina más elevado de la pared secundaria.
 - **S_2** : capa más gruesa, su espesor varía entre 1 y 9 μm y representa aproximadamente el 80% del espesor de la pared de las fibras. Comprende múltiples subcapas en las que la dirección de la hélice también va alternando. El ángulo de las microfibrillas con el eje longitudinal de la célula no sobrepasa generalmente los 30°. Asegura la rigidez de la fibra. La lignina y las hemicelulosas están químicamente unidas entre si y constituyen, con la matriz de S_2 , los complejos lignina-polisacáridos.
 - **S_3** : es la más delgada, con un espesor aproximado de 0,1 μm , pudiendo estar ausente. En ella las microfibrillas se depositan como en la S_1 , y están orientadas formando un ángulo de 70 a 80° con el eje longitudinal de la célula. Con frecuencia quedan revestidas internamente por una película de material no celulósico, que forma irregularidades a modo de verrugas (capa verrucosa) proveniente de la desaparición del citoplasma durante la duraminización de los tejidos.

3.3.- Celulosa bacteriana

3.3.1.- Generalidades

La celulosa no es sólo el componente mayoritario de la biomasa de las plantas, también la producen una gran variedad de organismos, incluyendo algas marinas y organismos procariotas (Bielecki *et al.*, 2005). En los últimos años la celulosa de origen bacteriano (CB) ha ganado importancia debido a sus extraordinarias propiedades (durabilidad, resistencia mecánica, moldeabilidad...). La CB es un polímero extracelular insoluble producido por varias especies de bacterias, como las pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Agrobacterium* y *Aerobacter* (Shoda y Sugano, 2005).

El género *Acetobacter* engloba un grupo de bacterias con habilidad para oxidar azúcares y etanol generando ácido acético. Entre los productores más eficaces de celulosa figuran *A. xylinum*, *A. hansenii* y *A. pasteurianus*. De entre ellos *A. xylinum* se ha tomado como organismo modelo para los estudios básicos y aplicados sobre celulosa bacteriana, debido a su habilidad para producir, partiendo de diversas fuentes de carbono y nitrógeno, altos niveles del polímero como producto primario de su metabolismo (Ramana *et al.*, 2000). Esta especie fue reclasificada e incluida en el nuevo género *Gluconacetobacter* como *Gluconacetobacter xylinus* (Yamada *et al.*, 1997) junto con otras especies (*G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* y *G. intermedius*). La cepa *G. xylinus* BPR2001, única cepa de la subespecie *G. xylinus subsp. sucrofermentans*, fue considerada una especie diferente y renombrada *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Cleenwerck *et al.*, 2010).

Gluconacetobacter sucrofermentans es una bacteria con una gran capacidad para producir celulosa (Toyosaki *et al.*, 1995). Tiene forma de varilla (figura 13), es aerobia estricta y Gram-negativa (Kerstens *et al.*, 2006). Sus hábitats naturales incluyen frutas y verduras en descomposición, zumos y soluciones alcohólicas (Franke-Whittle *et al.*, 2005).

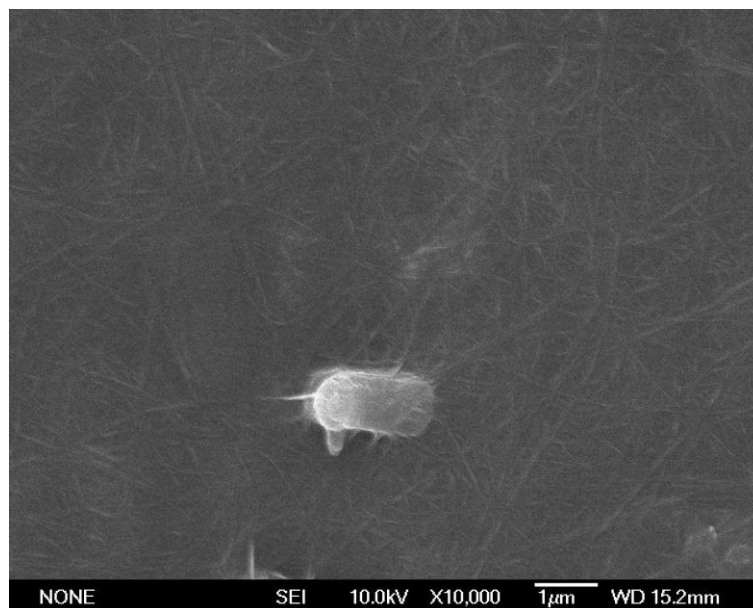


Figura 13. Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la bacteria *G. sucrofermentans* CECT 7291 excretando celulosa.

La estructura molecular de la celulosa que sintetiza *G. sucrofermentans* es idéntica a la de la celulosa vegetal, pero a diferencia de ésta la celulosa bacteriana se halla en la naturaleza con un elevado grado de pureza, libre de lignina, hemicelulosas y pectinas, así como de otros productos asociados a aquella (Bielecki *et al.*, 2002). Otra importante diferencia radica en su estructura, que la confiere propiedades físico-químicas que la distinguen de la celulosa vegetal, como su elevada cristalinidad, durabilidad, resistencia mecánica, moldeabilidad y biocompatibilidad (Klemm *et al.*, 2001). Gracias a esas propiedades únicas, resultado de una estructura reticulada ultrafina, la CB ha encontrado multitud de aplicaciones en biotecnología, microbiología y ciencia de los materiales.

Aunque Brown ya en 1886 observó la síntesis de un material gelatinoso extracelular por *G. xylinus* (Yunoki *et al.*, 2004), no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se empezaron a efectuar ensayos más intensivos sobre celulosa bacteriana utilizando *G. xylinus* como modelo, especialmente en el área de la medicina (Bielecki *et al.*, 2002; Jonas y Farah, 1998). Hestrin y Schramm (1954) probaron que tras ser liofilizadas y posteriormente reactivadas, células de *G. xylinus* sintetizaban celulosa en presencia de glucosa y oxígeno. Posteriormente Colvin (1957) detectó esta síntesis en

muestras que contenían extractos de células de *G. xylinus*, glucosa y ATP. Actualmente los estudios sobre CB y sobre las bacterias productoras se han ampliado considerablemente, y hoy se dispone de numerosos trabajos que han dado a conocer aspectos como la forma de crecimiento de la CB, su estructura y propiedades, las condiciones más favorables para su producción o las aplicaciones que se han propuesto en diversos ámbitos.

3.3.2.- Estructura y características

Aunque la celulosa bacteriana es químicamente idéntica a la celulosa vegetal, presenta diferencias significativas respecto a su conformación estructural y propiedades físicas (Keshk *et al.*, 2006). Su macroestructura es totalmente dependiente de las condiciones de cultivo (Yamanaka *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1998). Así, en condiciones estáticas se genera una película en la interfase aire/líquido del medio, mientras que un cultivo agitado da lugar a una dispersión en el líquido de glomérulos de celulosa.

Las cadenas de celulosa van surgiendo de los poros alineados de la célula bacteriana y forman subfibrillas de aproximadamente 1,5 nm de ancho que cristalizan en microfibrillas en el medio de cultivo (Jonas y Farah, 1998). Estas microfibrillas se agrupan en paquetes, y estos últimos en cintas o fibras (Yamanaka *et al.*, 2000) que, según estos autores, tienen unas dimensiones de 4 nm de espesor x 117 nm de anchura, pudiendo llegar a alcanzar una longitud de 20 µm según Zaar (1977). Durante el crecimiento bacteriano se generan nuevos focos de producción de CB que ensanchan estas fibras. En el momento de la mitosis celular, esos sitios de producción de CB se reparten entre las dos células hijas, lo que también incrementa el ancho de la fibra (Zaar, 1977). La geometría de estas fibras no es, por tanto, lineal, sino que contienen “puntos de ramificación de tres vías” a lo largo de su eje (figura 14), ocasionados por la bifurcación debida a la mitosis celular.

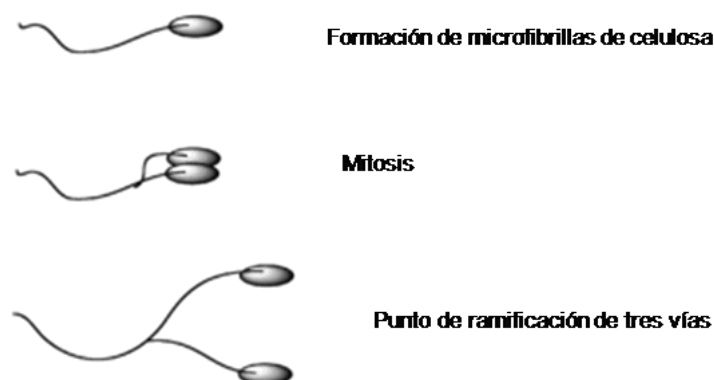


Figura 14. Mecanismo de las tres vías.

Estas cintas de CB recién generadas van girando en el medio y se entrelazan con cintas producidas por otras células para formar una capa gelatinosa (Brown, 1996). A su vez estas capas se disponen paralelamente y las contiguas se unen entre ellas tanto por enlaces de puentes de hidrógeno (Brett, 2000) como por fuerzas de Van der Waals. Cuando se elimina el agua existente entre capas, se forman nuevos enlaces entre los grupos hidroxilo de capas adyacentes y se forma una lámina donde la cristalinidad es superior al 60% (Colvin y Leppard, 1977). Al final de este proceso el material se ha convertido en una estructura reticulada, con un elevado número de enlaces intra e intermoleculares que proporcionan una elevada resistencia mecánica en seco y en húmedo (Jonas y Farah, 1998), y donde el grado de polimerización puede alcanzar incluso 16.000 o 20.000 unidades (Watanabe *et al.*, 1998), frente al de la celulosa vegetal, que se aproxima a las 15.000 unidades en la celulosa de algodón.

El mecanismo de cristalización de las microfibrillas en *G. sucrofermentans* puede dar origen a las dos aloformas de celulosa: si se orientan de forma paralela se sintetiza celulosa I, mucho más frecuente, mientras que si es la orientación es antiparalela se genera celulosa II. La relación entre los cristales tipo I α y I β depende del microorganismo que la excreta y de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, suplementos, temperatura) (Jonas y Farah, 1998).

Debido al menor diámetro de las microfibrillas, la CB posee una mayor área superficial que la celulosa vegetal. Este menor diámetro hace que la CB hidratada sea mucho más porosa que la celulosa vegetal. La presencia de estos poros y túneles dentro de la película hidratada, da como resultado una estructura fibrosa hinchada, con valores de retención de agua del 1000%, frente al 60% de la celulosa vegetal. Estos elevados valores de retención de agua y porosidad, determinan muchas de sus aplicaciones. Así, por ejemplo, facilitan la transmisión de antibióticos u otras sustancias, mientras que el polímero es una eficiente barrera física contra infecciones externas.

Una vez purificada la celulosa bacteriana es metabólicamente inerte, no tóxica, no alergénica, biocompatible y biodegradable (Duvey y Saxena, 2002). Otras características de la CB en comparación con las de la celulosa vegetal aparecen descritas en la tabla 3.

CARACTERÍSTICA	CELULOSA BACTERIANA	CELULOSA VEGETAL
Grado de polimerización	16000-20000 (1)	13000-14000 (1)
Módulo de Young (KPa)	4,9 (2)	Algodón: 0,085 (2)
Temperatura de degradación (°C)	200-270 (2)	Algodón: 150 (2)

Tabla 3. Comparación de diferentes características de las celulosas bacteriana y vegetal.

(1) Bielecki *et al.*, 2002; (2) Yamanaka *et al.*, 1989.

Cuando el tamaño de las fibras de celulosa se encuentra en el rango nanométrico, a este material se le denomina nanocelulosa. A estas escalas, los materiales tienen mejores propiedades ópticas, electrónicas, térmicas, mecánicas y de barrera. Por ello muchos nuevos materiales se están desarrollando a partir de la nanocelulosa y la investigación en este campo está siendo especialmente intensa. La celulosa bacteriana es, junto con la celulosa microfibrilar (MFC) y la celulosa

microcristalina (MCC), uno de los tres tipos de nanocelulosa existente (Plackett *et al.*, 2014).

Según Moon *et al.*, (2011), las dimensiones de estos tres tipos de nanocelulosas, comparadas también con la celulosa vegetal, son los siguientes (tabla 4):

CARACTERÍSTICA	CELULOSA VEGETAL	MCC	MFC	CB
Longitud (μm)	>2000	10-50	0,5-10	>1
Anchura (μm)	20-50	10-50	0,01-0,1	0,03-0,05
Altura (μm)	20-50	10-50	0,01-0,1	0,006-0,01

Tabla 4. Comparación de las dimensiones de la celulosa vegetal con las nanocelulosas, según Moon *et al.*, 2011.

3.3.3.- Funciones

En sus hábitats naturales, muchos microorganismos sintetizan polisacáridos extracelulares que envuelven sus células. *G. sucrofermentans* es capaz de producir CB sobre medios líquidos y sólidos, con una misión fundamentalmente de protección mecánica, química y biológica. Las células productoras de celulosa quedan atrapadas en la red del polímero, que forma una película sobre la superficie permitiendo al organismo obtener con mayor facilidad el oxígeno necesario para su crecimiento (Ross *et al.*, 1991). La CB es también responsable de la adherencia de las células a las superficies y facilita el suministro de nutrientes por difusión a través de ella (Costerton *et al.*, 1999). En la figura 15 se observa cómo las células bacterianas excretan fibras de celulosa.

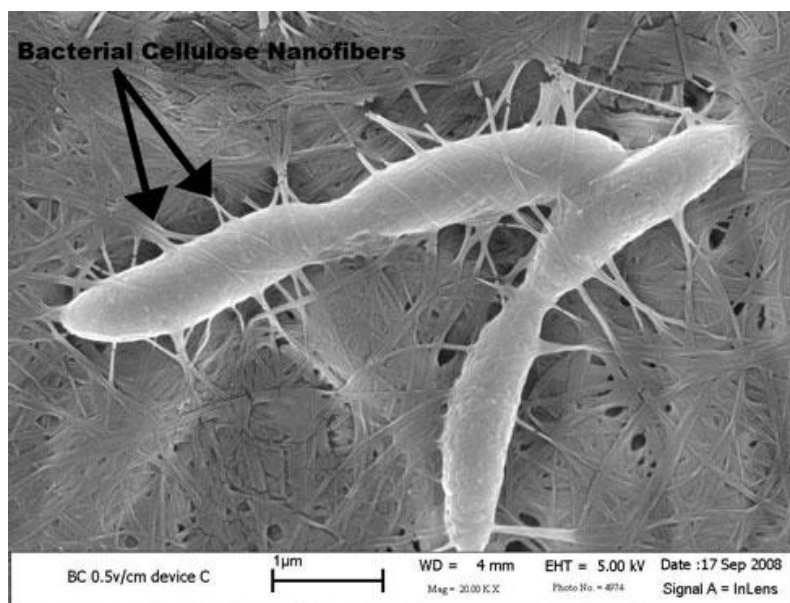


Figura 15. Imagen SEM de las células de *G. xylinus* entre la CB que genera. Foto extraída de: Virginia Tech, “Invention controls weavers of nanoscale biomaterials”.

La viscosidad y naturaleza hidrofílica que muestra la CB durante su formación, hacen que incremente la resistencia del microorganismo productor frente a cambios desfavorables, como un descenso en el contenido de agua, variaciones de pH, aparición de sustancias tóxicas, organismos patógenos, etc., protegiendo también a las bacterias de la luz UV (Ross *et al.*, 1991). Hasta un 23% de células envueltas por CB son capaces de sobrevivir a una hora de tratamiento con luz UV, porcentaje que baja al 3% en caso de eliminar el polisacárido, según Ross *et al.*, 1991.

Algunos autores han propuesto que la CB sintetizada por *G. sucrofermentans* desempeña, además, un papel de almacenaje de alimento que el microorganismo podría utilizar en caso de necesidad. La presencia de exo- y endo-glucanasas en el caldo de cultivo de algunas fermentaciones apoyarían esta suposición (Bielecki *et al.*, 2002)

3.3.4.- Biosíntesis

Las bacterias del género *Gluconacetobacter* producen celulosa a partir de diversas fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol con alrededor de un 50% de eficacia (Keshk y Sameshima, 2005; Bielecki *et al.*, 2002). En *G.xylinus* la síntesis de celulosa está íntimamente relacionada con el proceso catabólico de oxidación, y consume, como mucho, el 10% de la energía derivada de las reacciones catabólicas (Weinhouse *et al.*, 1997).

Dos vías anfibólicas importantes operan en *G. sucrofermentans*, el ciclo de la pentosa fosfato para la oxidación de carbohidratos, y el ciclo de Krebs para la oxidación de ácidos orgánicos (Ross *et al.*, 1991). Por otra parte, la bacteria es capaz de producir glucosa a partir de sustratos como glicerol, citrato y otros intermediarios del ciclo de krebs mediante gluconeogénesis. La síntesis de celulosa en *G. sucrofermentans* y otros organismos productores de celulosa, incluidos las plantas, consta de varias etapas que incluyen dos mecanismos fundamentales (figura 16): el primero es la conversión de la fuente de carbono en uridín difosfato glucosa (UPD-Glucosa), que es el precursor de la celulosa, siendo el segundo la polimerización de la glucosa en cadenas largas de celulosa, la asociación de estas nuevas cadenas en cintas y su excreción al medio de cultivo (Chawla *et al.*, 2009; Bielecki *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 1991).

La producción de UPD-Glucosa comienza con la entrada de la fuente de carbono. Si la fuente de carbono es una hexosa, como la fructosa y la glucosa, la bacteria las convierte directamente a glucosa-6-fosfato para la síntesis del polisacárido (Weinhouse y Benziman, 1974). De lo contrario la fuente de carbono (glicerol, piruvato...) entra en el ciclo de Krebs, gluconeogénesis o ciclo de las pentosas fosfato, dependiendo de cuál sea dicha fuente de carbono. La enzima glucoquinasa cataliza la fosforilación a glucosa-6-fosfato. El siguiente paso es la isomerización de este intermediario a glucosa-1-fosfato catalizado por la enzima fosfoglucomutasa y la conversión de este último metabolito a UDP-glucosa en presencia de la enzima uridín difosfato glucopirofosforilasa. El nucleótido UDP-Glucosa es el sustrato de la enzima celulosa sintasa (Swisa *et al.*, 1980). La actividad pirofosforilasa varía según las cepas y la mayor actividad ha sido detectada en el productor de celulosa más eficaz, esto es, la cepa *G. sucrofermentans*. Esta cepa

muestra gran actividad de fosfoglucoisomerasa y posee un sistema de fofotransferasas dependiente de fosfoenolpiruvato. El sistema cataliza la conversión de fructosa a fructosa-1-fosfato y luego a fructosa-1,6-bifosfato.

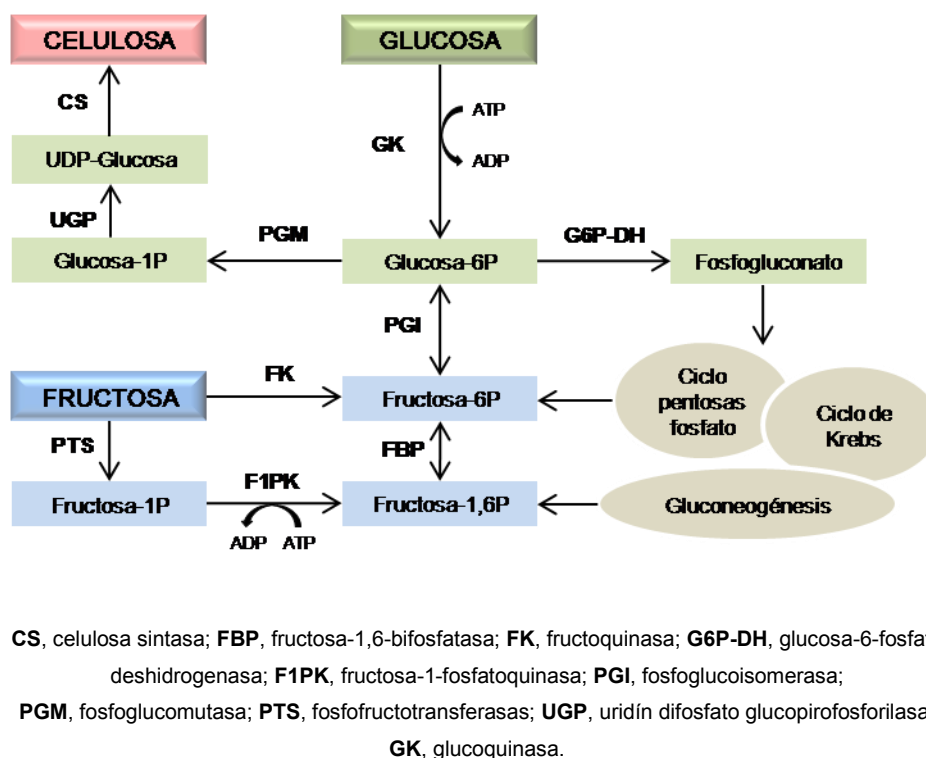


Figura 16. Rutas del metabolismo del carbono en *G. sucrofermentans*. Modificado de Chavez-Pacheco *et al.*, 2004.

Una vez formada la cadena de celulosa, ha de ser excretada al exterior. La membrana celular del microorganismo posee una serie de poros de 3,5 nm alineados diametralmente. En la cara interna de la membrana se encuentra el complejo enzimático celulosa sintasa (CS) rodeando cada uno de los poros (Marx-Firgini y Pion, 1974). Estos complejos pueden polimerizar más de 200.000 moléculas de glucosa por segundo a cadenas de β -1,4-glucano. El polímero debe atravesar la membrana plasmática y emerger en el espacio extracelular donde, mediante enlaces de puentes de hidrógeno, se asocia a otras cadenas de polímero formando agregados cristalinos. Existen diversas

hipótesis sobre el modo en el que el sustrato es utilizado por la CS, sin que existan datos contundentes para validar alguna de ellas. Teniendo en cuenta las tres etapas (polimerización, extrusión y cristalización), se proponen los siguientes modelos:

- Modelo I. Sitio catalítico de la CS orientado al citoplasma. Se basa en la predicción de los segmentos transmembrana y en la disponibilidad del sustrato, se propone que la catálisis y la polimerización tiene lugar en el citoplasma y la extrusión requiere de una estructura de “poro” proporcionada por la CS o por otras proteínas asociadas a ella.
- Modelo II. Sitio catalítico de la CS orientado al espacio extracelular. La catálisis y la polimerización se llevan a cabo en el espacio extracelular y no se requiere proceso de extrusión.
- Modelo III. Catálisis asociada a intermediarios lipídicos. El sitio catalítico está en el citoplasma, la polimerización se da en el citoplasma asociada a un intermediario lipídico, se requiere de un proceso de extrusión.
- Modelo IV. Asociación de glicosil-transferasas. El modelo indica que la glucosa primero se adiciona a un compuesto lipídico (lipidil-UDP-glucosa) del lado citoplásmico de la membrana celular, el intermediario lipídico se mueve al lado extracelular de la membrana, en donde una transferasa aditiva cataliza la polimerización. Así hay un sitio catalítico ubicado en el lado citoplásmico y otro extracelular, la polimerización ocurre en el espacio extracelular y no se requiere extrusión.

3.3.5.- Factores que afectan a la producción

Existen estudios sobre el mecanismo de síntesis de la celulosa bacteriana, su estructura y propiedades (Kai *et al.*, 1999), que han puesto de manifiesto que su producción depende estrechamente del método de cultivo (estático o agitado), de las fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la temperatura (Chawla *et al.*, 2009).

Schramm y Hestrin realizaron en 1954 uno de los primeros trabajos sobre celulosa bacteriana en el que concluyeron que su producción depende de la disponibilidad de oxígeno, tanto para cultivo estático como agitado. Comprobaron que bajo una atmósfera de nitrógeno no se producían cantidades significativas mientras que con aire enriquecido en oxígeno la producción alcanzaba máximos. Desarrollaron también un medio de cultivo que aún hoy sigue usándose, y que es referencia para estudios sobre CB. La composición de este medio, conocido como medio HS es glucosa 2% (p/v), peptona 0,5%, extracto de levadura 0,5%, fosfato disódico 0,27%, y ácido cítrico 0,115%.

3.3.5.1.- Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la bacteria y para la producción de celulosa, debe contener carbono, nitrógeno y otros macro y micro nutrientes. Se han ensayado diferentes tipos de fuentes de carbono (mono y oligosacáridos, alcoholes o ácidos), para maximizar la producción de CB con distintas cepas de *G. xylinus*. Así, para la cepa de *G. xylinus* ATCC 5352 los rendimientos de CB son más altos con sacarosa y glicerol (Mikkelsen *et al.*, 2009). La sacarosa también dió el mejor resultado para *Acetobacter* sp. 4B-2 (Pourramezan *et al.*, 2009) y el glicerol para *G. xylinus* ATCC 10245 (Keshk y Sameshima, 2005), mientras que la glucosa es la mejor fuente de carbono hallada para *Acetobacter lovaniensis* HBB5 (Çoban y Biyik, 2011).

La producción de CB también puede mejorarse con una elección adecuada de las fuentes de nitrógeno. Así Çoban y Biyik (2011), seleccionaron el extracto de levadura para la producción de CB por *A. lovaniensis* HBB5, mientras que Tsuchida y Yoshinaga (1997), y Rani y Appaiah (2011), comprobaron que el extracto de maíz es eficaz para *G. sucrofermentans* y para *G. hansenii* UAC09, respectivamente.

El efecto combinado de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de CB ha sido menos estudiado. Ramana *et al.* (2000) propusieron distintas combinaciones para producir CB con *A. xylinum*, encontrando que las mejores opciones fueron usar sacarosa o manitol como fuente de carbono (frente a la glucosa), y peptona y el

hidrolizado de caseína como fuente de nitrógeno (frente al sulfato de amonio y la harina de soja).

Naritomi *et al.* (1998) observaron que un suplemento de un 1% de etanol a un medio que contenga $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa, incrementa la producción de CB por *G.sucrofermentans* BPR3001A. El estudio sugiere que el etanol no actúa como un sustrato para la biosíntesis de CB, sino como una fuente de energía para la generación de ATP de las células viables, incrementando así la producción de CB. Resultados similares se encuentran en estudios con *G.hansenii*, (Park *et al.*, 2003) y con *A. xylinum* ATCC 10245 (Yunoki *et al.*, 2004). En este estudio posterior, los autores han sugerido que la mejora se debe a que el etanol suprime la transformación de la glucosa en ácido glucónico, lo que permite una polimerización más eficaz de la glucosa en celulosa. Sin embargo, si el porcentaje de etanol añadido sube por encima del 1,5%, la producción de CB disminuye debido a la inhibición del crecimiento celular causada por la producción de acetato (Park *et al.*, 2003; Naritomi *et al.*, 1998). En la figura 17 se puede comprobar la diferencia de crecimiento de CB en un medio de cultivo con un 1% de etanol comparado con el crecimiento en un medio de cultivo sin etanol.

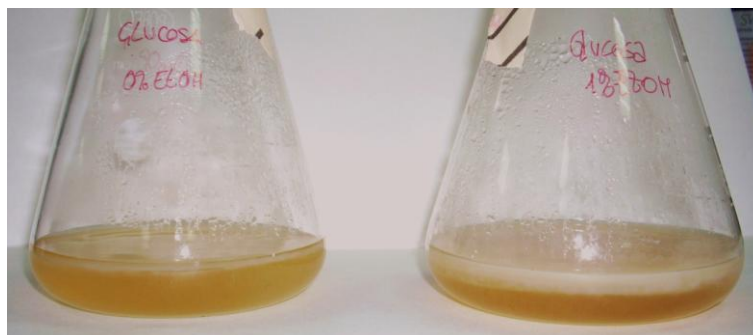


Figura 17. Efecto del etanol en la producción de CB por *G. sucrofermentans* CECT 7291.

De los estudios anteriores se desprende que no hay un patrón evidente de comportamiento que permita seleccionar de antemano las fuentes de carbono y nitrógeno para una cepa dada. Además, en la mayoría de los estudios consultados el criterio de selección prioritario ha sido la tasa de producción de celulosa, sin tener en cuenta el uso

previsto. Ahora bien, ya que la CB ha mostrado resultados prometedores en áreas tan diversas como la medicina o la ciencia de los materiales (Chawla *et al.*, 2009), el criterio de calidad también debe ser considerado en la selección. Así, en el área de restauración de papeles hay parámetros tales como la resistencia mecánica, la blancura o su estabilidad en el tiempo, que también deben ser considerados a la hora de implementar o no su uso. Algunos estudios han comprobado las propiedades mecánicas del papel hecho mezclando un pequeño porcentaje de CB con celulosa vegetal (Gao *et al.*, 2011; Basta y El-Saied, 2009; Surma-Slusarska *et al.*, 2008), pero hay pocos estudios sobre papel hecho exclusivamente de CB (Gea *et al.*, 2011; Yamanaka *et al.*, 1989).

3.3.5.2.- Temperatura y pH

Para la mayoría de las especies, los valores óptimos de pH del cultivo para la generación de CB se sitúan entre 4 y 8 (Son *et al.*, 2001), estando la mayor eficacia localizada a un pH próximo a 6,5 (Çoban y Biyik, 2011; Son *et al.*, 2001). El control del pH es especialmente importante en cultivos estáticos, para evitar la acumulación de ácidos glucónico, acético o láctico, que harían que el pH disminuyera muy por debajo del rango óptimo. Las temperaturas más adecuadas para el cultivo se sitúan entre 28 y 30°C, estando la máxima efectividad cerca de los 30°C (Pourramezan *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2001).

3.3.5.3.- Técnicas de Cultivo

La elección de la técnica de cultivo depende del uso que se vaya a dar a la CB, considerando que su morfología macroscópica depende de ella (Yamanaka *et al.*, 2000). Las técnicas utilizadas para producir CB son el cultivo estático y el agitado, que se describen someramente a continuación.

Cultivo Estático

En el cultivo estático la celulosa se acumula formando una película en la superficie del medio de cultivo (Czaja *et al.*, 2004). En la figura 18 se puede observar un ejemplo de

película de CB obtenida en cultivo estático. Para este método de cultivo se han utilizado, tradicionalmente, matraces Erlenmeyer, frascos Roux y bandejas.

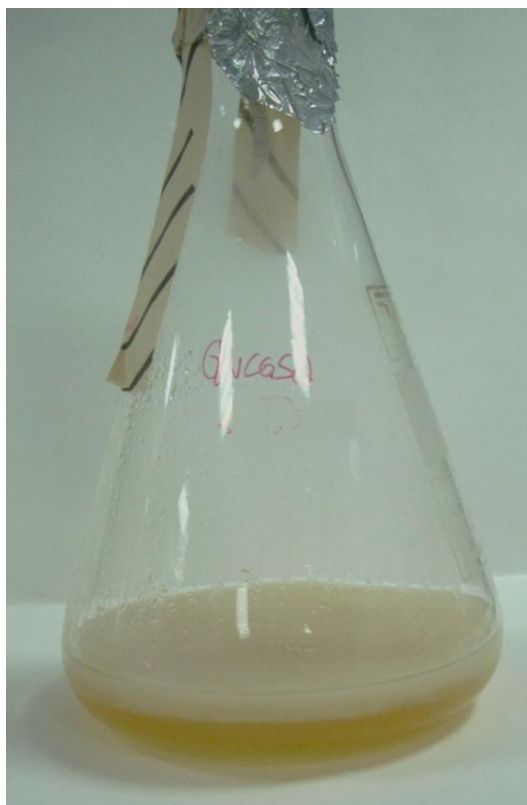


Figura 18. Película de CB generada por *G. sucrofermentans* CECT 7291, en cultivo estático en un matriz Erlenmeyer.

En un primer momento el microorganismo incrementa su población consumiendo el oxígeno disuelto en el medio de cultivo, a la vez que las bacterias comienzan a sintetizar celulosa. Con el progreso de la fermentación aumenta el espesor de la membrana mediante la generación de nuevas capas que se unen entre sí por numerosos enlaces (Klemm *et al.*, 2001; Borzani y De Souza, 1995). Cuando se agota el oxígeno disuelto en el medio, sólo las bacterias que se encuentran en las inmediaciones de la interfase aire/medio de cultivo pueden mantener su actividad productora, mientras que las bacterias que permanecen en la fase líquida se encuentran en un estado de letargo, aunque pueden ser reactivadas y usadas como inóculo en una fermentación posterior (Klemm *et al.*, 2001).

Klemm *et al.* (2001) postularon la existencia de tres zonas en la celulosa generada: superficial, intermedia e inferior (figura 19). La zona inferior es la que primero se ha producido, en ella la densidad de celulosa es menor ya que la producción está asociada al crecimiento celular, y éste es bajo los primeros días de cultivo. Según va aumentando la población bacteriana, la densidad de la celulosa producida también aumenta, dato que se aprecia en la zona media de la membrana. La zona superficial se caracteriza por ser una estructura compacta y con una alta población bacteriana.



Figura 19. Distintas zonas de la capa de celulosa bacteriana generada por *G. sucrofermentans* CECT 7291.

El inconveniente de los cultivos estáticos es que requieren tiempos largos de fermentación y una gran área superficial, por lo que no resultan prácticos para producciones a gran escala. Caicedo *et al.* (2001) encontraron que la producción máxima de celulosa se daba cuando la concentración inicial de glucosa era de $20\text{--}50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y la relación área superficial·volumen⁻¹ de medio era de $0,3\text{--}0,8\text{ cm}^{-1}$. Se ha estudiado extensamente la celulosa producida en cultivo estático, puesto que las membranas obtenidas tienen gran uso en diversos campos, especialmente en medicina y en membranas de separación. Algunos de estos estudios se enfocan en el escalado con miras a una mayor producción, mientras que otros se concentran en las propiedades de la estructura como conformación, propiedades térmicas y mecánicas, cristalinidad, etc (Chawla *et al.*, 2009; Czaja *et al.*, 2004; Astley *et al.*, 2003; Baranov *et al.*, 2003).

Cultivo Agitado

Al realizar las fermentaciones en cultivo agitado se obtienen pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras. Dado que la producción de CB depende directamente del crecimiento de las bacterias productoras, el aporte de oxígeno es básico para incrementar dicha producción. Sin embargo, si el aporte es excesivo, hay una pérdida de sustrato por oxidación directa con la consecuente disminución de productividad (Yamanaka *et al.*, 1989). Las turbulencias durante la generación de CB afectan negativamente a la polimerización y cristalización de la celulosa, reduciendo la formación del polímero (Zuo *et al.*, 2006), hecho que puede controlarse optimizando la agitación y la aireación.

Un problema habitual, cuando se efectúa cultivo agitado, es la formación espontánea de células mutantes no productoras de celulosa, que conllevan la disminución de la síntesis del polímero (Ross *et al.*, 1991). Son *et al.*, (2001) evaluaron el efecto de la adición de varios co-sustratos en el medio de cultivo. En todos los casos hubo un incremento en la celulosa obtenida con respecto al medio sin co-sustrato, atribuible a que la mayor parte de estos compuestos se encontraban cerca del ciclo del ácido tricarboxílico en la ruta metabólica del microorganismo, siendo así utilizados en el crecimiento celular y la producción de energía. Kouda *et al.*, (1998) estudiaron el efecto de añadir CO₂, encontrando que se inhibe el crecimiento del microorganismo y, como consecuencia, disminuye la producción de celulosa.

Los cultivos agitados pueden realizarse por lotes o en continuo, utilizándose reactores de tanque agitado o reactores airlift. El principal inconveniente con los reactores de tanque agitado es la gran cantidad de energía que se necesita para mantener un buen mezclado, incrementando los costos de producción (Kouda *et al.*, 1997a; Kouda *et al.*, 1997b). Chao *et al.*, (2001) presentaron una alternativa para enfrentar este problema utilizando reactores de columna de burbujeo. En un estudio realizado por Caicedo *et al.*, (2002) con un reactor de tambor rotatorio, se encontró que la capacidad de producción de la bacteria es similar a la del cultivo estático. Sin embargo, presentó problemas para un mezclado eficiente, debido a la presencia de zonas muertas dentro del sistema. Una variante de este reactor es el empleado por Serafica *et al.*, (2002), con discos de material

polimérico en el eje rotatorio sobre los cuales se forma la celulosa. Los reactores de película son aquellos donde se permite que el microorganismo forme una película biológica para que se adhiera. Esta es una manera de aumentar la densidad celular y, por tanto, también la producción de celulosa bacteriana.

3.3.6.- Purificación

La celulosa obtenida tras la fermentación contiene impurezas tales como células y componentes del medio de cultivo, con lo que se hace necesaria su purificación antes de utilizarla en cualquier aplicación posterior. Los métodos de lavado más extendidos son los basados en tratamientos con álcali (NaOH, KOH), ácidos orgánicos como el ácido acético, el uso de dodecil sulfato de sodio y Na_2CO_3 , o lavados repetidos con agua de ósmosis inversa o agua caliente durante un determinado periodo de tiempo. Las etapas de purificación anteriores se pueden efectuar en distintos tiempos y pueden realizarse solas o combinadas (Bielecki *et al.*, 2005). El tratamiento con disoluciones tales como NaOH, KOH o Na_2CO_3 a altas temperaturas, se utiliza para lisar las células microbianas atrapadas en la CB. Tras este tratamiento se debe lavar esta CB con agua destilada en repetidas ocasiones para arrastrar y eliminar los materiales disueltos. En la figura 20 se puede observar una capa de celulosa bacteriana generada por *G. sucrofermentans* CECT 7291, antes y después de su purificación mediante un tratamiento con hidróxido sódico al 1%.

a)



b)



Figura 20. Lámina de CB antes (a) y después (b) de su purificación mediante un tratamiento con NaOH al 1% durante una hora a 90°C, seguido de un intenso lavado con agua destilada.

El uso médico de la CB requiere procedimientos de purificación especiales para eliminar tanto las células bacterianas como las toxinas. Uno de los protocolos más eficaces es procesar la capa de CB entre hojas absorbentes para eliminar alrededor del 80% de la fase líquida y luego sumergirla en NaOH al 3% durante 12 horas. Este procedimiento se repite tres veces y tras él se incuba la capa de CB en una disolución de HCl al 3%, se prensa y se lava con agua destilada. La CB purificada se esteriliza en autoclave o mediante radiación con ^{60}Co .

Ahora bien, si el tratamiento de purificación seleccionado es la inmersión en NaOH, hay que tener en cuenta que puede causar la transformación de la celulosa I en celulosa II. La transformación comienza con la el hinchamiento de las fibras seguida por un incremento significativo de la movilidad de las cadenas de celulosa. Después, la solución alcalina penetra en las áreas amorfas de celulosa, para posteriormente perturbar las regiones cristalinas, formando finalmente nuevas redes cristalinas tras el lavado de la disolución. Durante la transformación de celulosa I a celulosa II ocurre un cambio en la conformación de paralela a antiparalela acompañada por la rotura de numerosos enlaces de puente de hidrógeno, tanto intra como intermoleculares. Sin embargo, algunos autores han indicado que esa transformación ocurre sólo en concentraciones de NaOH por encima del 6% (Le Moigne y Navard, 2010). Los efectos del tratamiento alcalino en las propiedades mecánicas de la celulosa no están del todo esclarecidos. George *et al.* (2005) concluyeron que un tratamiento con NaOH 0,1 M disminuía las propiedades mecánicas comparadas con las de la celulosa nativa, mientras que Nishi *et al.* (1990) consiguieron mejorar las propiedades mecánicas de la CB con NaOH 1,25 M. En este último estudio las muestras tratadas durante 30 minutos en NaOH 0,1 M no presentaron ninguna variación significativa con respecto a la celulosa sin tratar.

3.3.7.- Aplicaciones

La estructura y propiedades únicas de la CB determinan su multitud de aplicaciones en biotecnología, microbiología y ciencia de los materiales. Con los avances efectuados en los últimos años, la celulosa bacteriana ya está siendo utilizada en un amplio abanico de aplicaciones comerciales, incluyendo textiles, cosméticos y

aplicaciones médicas, dando lugar a muchas patentes y ampliando así el área de investigación para poder ser utilizada en nuevas áreas. Muchas investigaciones se han enfocado en el mecanismo de síntesis del polímero así como en su estructura y en las propiedades que determinan su uso práctico (Park *et al.*, 2010; Czaja *et al.*, 2007).

La ausencia de otras sustancias favorece el procesamiento de la CB en las plantas de polisacáridos sin necesidad de efectuar purificaciones previas. Son destacables sus propiedades mecánicas tanto en seco como en húmedo, porosidad, absorción de agua, biodegradación y excelente afinidad biológica (Shoda y Sugano, 2005). Además es moldeable, su área y espesor pueden ser hechos a medida según las condiciones de cultivo. Pueden hacerse también relativamente sencillas modificaciones durante la biosíntesis que permiten regular propiedades como la elasticidad, resiliencia o el índice de cristalinidad.

Alimentación

El uso más antiguo conocido de la celulosa bacteriana es el alimento filipino denominado “nata de coco” (Iguchi *et al.*, 2000). Debido a su textura y contenido en fibra se añade también a muchos alimentos dietéticos. Un ejemplo específico es el producto llamado Cellulon, agente de carga usado como reductor de calorías en ciertos alimentos. También se ha utilizado como un aditivo en bebidas dietéticas en Japón desde 1992, específicamente kombucha, un tipo de té. Se usa también como espesante, estabilizante y ligante en muchos productos alimenticios (Thompson y Hamilton, 2001).

Medicina

En el campo de la medicina se han evaluado diversas aplicaciones, por ejemplo como sustituto temporal de la piel para el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras y abrasiones en la epidermis (Cai *et al.*, 2009; Czaja *et al.*, 2007). Para dotarla de un mayor efecto antimicrobiano, Maneerung *et al.*, (2008) desarrollaron un material compuesto de celulosa bacteriana y nanopartículas de plata. Los estudios han demostrado que las quemaduras tratadas con revestimientos de celulosa microbiana han curado más rápido que los tratamientos tradicionales y dejando menos cicatrices. Las aplicaciones tópicas de celulosa microbiana son efectivas debido a su capacidad de retención de agua, que

proporciona una atmósfera húmeda en el sitio de la lesión, mientras que la permeabilidad al vapor de agua permite despegarla bien de la herida para ser eliminada. Se han patentado en este sentido diversos productos, como XCell®, que se utiliza principalmente para el tratamiento de heridas de úlceras venosas. Otros productos comerciales son Biofill® y Gengiflex®, desarrollados como sustitutos temporales de la piel, para cubrir heridas y en implantes dentales (Chawla *et al.*, 2009; Yoshinaga *et al.*, 1997; Fontana *et al.*, 1990).

Klemm *et al.* (2001) desarrollaron implantes vasculares para microcirugía gracias al diseño de un reactor que permite obtener celulosa bacteriana en forma tubular. Estos implantes presentan buena compatibilidad con los tejidos (Schumann *et al.*, 2008). La capacidad para ser moldeada ha permitido también su uso como reemplazo de estructuras para diferentes zonas, tales como el sistema cardiovascular, el tracto digestivo, tracto urinario, o la tráquea. Una aplicación reciente ha sido como vasos sanguíneos sintéticos. La CB también se puede modelar en membranas de malla que se pueden utilizar para estructuras de sustitución internas, tales como la membrana externa del cerebro. Además de la sustitución, estas estructuras también se han utilizado como injertos para interactuar con el material biológico existente interno.

La celulosa bacteriana se ha usado como soporte en ingeniería de tejidos, especialmente para reparar tejido cartilaginoso. En los trabajos de Brackmann *et al.* (2010), y Nwe *et al.* (2010), el soporte de celulosa presentó buena resistencia mecánica, además de permitir la proliferación de queratocitos humanos y de conservar su viabilidad. También se ha utilizado para los tratamientos internos, tales como los injertos óseos y la ingeniería de otros tejidos y la regeneración. Así, para reemplazo de tejido óseo se ha formado un material compuesto con hidroxiapatita (Zaborowska *et al.*, 2010), y con alcohol polivinílico para implantes de córnea, mostrando biocompatibilidad, y ausencia de necrosis en el tejido implantado (Wang *et al.*, 2010).

Los sensores de glucosa normales están recubiertos con una membrana de celulosa de origen vegetal; una de sus principales desventajas es su corta vida útil. Al recubrir estos sensores con celulosa bacteriana, Ammon *et al.* (1995), encontraron que aumenta su vida útil y su estabilidad al contacto con la sangre.

Otras aplicaciones potenciales en el área de la medicina debido a sus propiedades son: como soporte para cultivo de células de mamíferos (Watanabe *et al.*, 1993), inmovilización de enzimas y otras biomoléculas (Wu y Lia, 2008), sustrato para cultivo de tejidos (Li *et al.*, 2009) y en sistemas de liberación controlada de medicamentos (Stoica-Guzun, *et al.*, 2007).

Electrónica

En el campo de la electrónica se han desarrollado membranas de celulosa bacteriana con alta conductividad eléctrica y dispositivos emisores de luz, incorporando para ello algunos metales en la estructura de la celulosa (Shen *et al.*, 2009; Legnani *et al.*, 2008). Se han modificado algunas membranas con paladio y platino para ser utilizadas en celdas de combustible (Sun *et al.*, 2010).

Otra aplicación comercial de la celulosa bacteriana son los transductores acústicos, dada la gran resistencia mecánica que adquiere la celulosa después de ser sometida a un tratamiento químico (Ciechańska *et al.*, 2002). Debido a su alta velocidad sónica y baja pérdida dinámica, la celulosa bacteriana se ha utilizado como una membrana o un filtro acústico en altavoces y auriculares de alta fidelidad, como el comercializado por la Corporación Sony.

Membranas de separación

Pueden emplearse en separación de soluciones acuosas, tales como filtración molecular, ultrafiltración, diálisis, permeación con vapor y pervaporación (Saibuatong y Phisalaphong, 2010; Duvey *et al.*, 2005; Duvey y Saxena, 2002; Wanichapichart *et al.*, 2002; Shibazaki *et al.*, 1993).

Papel

Algunos estudios han evaluado las propiedades mecánicas del papel que se obtiene al añadir un pequeño porcentaje de CB a las fibras de celulosa vegetal. Según Surma-Slusarska *et al.*, (2008), este tipo de papeles tienen mejores propiedades

mecánicas que los fabricados exclusivamente con celulosa vegetal. Así, si se efectúa la biosíntesis de CB en presencia de fibras vegetales aumenta la resistencia a la tracción y al desgarro, lo mismo que si se añaden películas de CB desintegradas a pulpas de papel. Si se pone una película de CB en una hoja de papel vegetal y se seca en un aparato de laboratorio tipo Rapid-Koethen, aumenta la longitud de rotura aunque, en este caso, disminuye el índice de desgarro. Gao *et al.*, (2011) duplicaron los índices de desgarro y estallido añadiendo un 5% de CB a una pasta de papel. Según Pommet *et al.*, (2008) cuando la biosíntesis de CB se realiza en presencia de fibras naturales, la formación de esa CB se efectúa preferentemente alrededor de dichas fibras.

Hay muy pocos estudios sobre las propiedades mecánicas del papel hecho exclusivamente de CB. Yamanaka *et al.*, (1989, 1990) encontraron un módulo de Young mayor de 15GPa, indicando que un tratamiento alcalino mejora significativamente las propiedades mecánicas del papel hecho con CB.

II.- OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

1.- OBJETIVOS

En la presente tesis doctoral se propone el uso de celulosa bacteriana como material para restaurar documentos deteriorados, ya que es un material que posee buenas propiedades mecánicas y que no sólo es compatible con la celulosa vegetal sino que tiene tendencia a unirse a ésta. El objetivo principal de esta tesis es obtener una celulosa bacteriana con características adecuadas para su uso en restauración, crear un protocolo de aplicación al material a restaurar, y comprobar la eficacia de dicha restauración y su estabilidad en el tiempo. Para ello se contemplan los siguientes objetivos específicos:

1.- Optimización del medio de cultivo para obtener una celulosa con características adecuadas para la restauración. Teniendo en cuenta que se ensayarán dos métodos de aplicación diferentes, se evaluará si el medio de cultivo optimizado es el mismo para ambos métodos o si por el contrario se obtienen dos medios de cultivo optimizados diferentes. Los métodos de aplicación a ensayar serán:

(a) Producción de láminas de celulosa bacteriana y su aplicación posterior al material a restaurar mediante el uso de adhesivos.

(b) Generación directa de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar.

2.- Caracterización de la celulosa bacteriana generada, según el primer objetivo, con los medios de cultivo optimizados. Se podrá aumentar el conocimiento sobre la posible aplicación de la celulosa bacteriana generada en la restauración de papel, gracias a la obtención de sus características físicas y estructurales.

3.- Aplicación de la celulosa bacteriana al papel dañado según los métodos (a) y (b). Se caracterizará el material reforzado resultante y, en el caso del método (a), se comparará la capacidad de la celulosa bacteriana como material de refuerzo para laminación, con la del papel japonés, material actualmente utilizado para este fin.

4.- Estudio de la conservación en el tiempo de las propiedades del documento restaurado con ambos métodos, (a) y (b), mediante un proceso de envejecimiento acelerado.

2.- ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para lograr los objetivos propuestos, la presente tesis se estructura en los bloques descritos a continuación.

2.1.- Optimización del medio de cultivo

Tomando como base el medio de cultivo HS, ampliamente utilizado para la generación de celulosa bacteriana, se seleccionaron las fuentes de carbono y nitrógeno que dieron lugar a la celulosa bacteriana con las características más adecuadas para su posible uso en restauración. Se fijó una temperatura de cultivo de 30°C, un pH inicial cercano a 6,5 y unas condiciones de cultivo estáticas. En una primera etapa se seleccionó la fuente de carbono óptima. Utilizando el medio HS modificado con dicha fuente de carbono óptima, se seleccionaron las fuentes de nitrógeno más adecuadas. Finalmente, se evaluó el efecto que la adición de un 1% de etanol tiene sobre las capas de celulosa obtenidas con el medio de cultivo seleccionado.

Para evaluar las características de las capas de celulosa bacteriana generada en los tres casos descritos, se analizaron cinco láminas para cada uno de los diferentes medios de cultivo a los 4, 7, 10 y 13 días de cultivo. En cada condición y tiempo se determinó el pH en el medio de cultivo residual con un pH-metro Crison GLP22+. Se midió también en dicho medio residual, la concentración de fuente de carbono usando kits enzimáticos específicos de Megazyme. Las capas de celulosa bacteriana obtenidas se lavaron abundantemente con agua destilada, y su pH se midió usando el mismo pH-metro, con un electrodo de superficie. Posteriormente las capas de celulosa bacteriana se purificaron con hidróxido de sodio al 1% y agua destilada, tras lo que se determinó nuevamente su pH superficial. Los films secos y acondicionados se caracterizaron en términos de su gramaje, resistencia al estallido, resistencia al desgarro, opacidad y amarilleamiento.

2.2.- Caracterización de la celulosa bacteriana optimizada

Los posibles usos de la celulosa bacteriana dependen en gran parte de sus propiedades, por ello el siguiente paso fue caracterizar las láminas generadas con los medios de cultivo optimizados para los dos métodos de restauración descritos. En todos los casos las capas fueron ensayadas tras someterse a filtración en un embudo Büchner de diámetro adecuado y su posterior secado al aire. Se ensayaron también estas capas de celulosa bacteriana tras ser sometidas a un proceso de envejecimiento acelerado, para evaluar su comportamiento con el paso del tiempo.

Las capas de celulosa bacteriana se analizaron tras 7 días de cultivo. Se acondicionaron las capas, envejecidas y sin envejecer, bajo parámetros estándar (23°C y 50% de humedad relativa) antes de su análisis. Se caracterizaron al menos 5 láminas diferentes en términos de sus propiedades mecánicas (resistencia al estallido y al desgarro), ópticas (blancura, opacidad y amarilleamiento), de superficie (ángulos de contacto estáticos), porosidad (porosimetría de intrusión de mercurio), cristalinidad (difracción de rayos-X), morfología (SEM), viscosidad y análisis FT-IR. Las propiedades mecánicas, ópticas y de superficie, así como la porosidad, son parámetros de interés en la fabricación de papel y determinarán el uso y la durabilidad de la celulosa bacteriana en la restauración de papel. Otras propiedades, tales como la cristalinidad y la viscosidad, se refieren a la estructura y la integridad de la celulosa, mientras que la espectroscopía de FTIR se ha utilizado para determinar la presencia de sustancias no celulósicas en las muestras.

2.3.- Procesos de restauración

2.3.1.- Material a restaurar

Los dos procedimientos que se evaluaron (generación *in situ* de la celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar, y generación *a priori* de la celulosa bacteriana y su posterior aplicación al papel a restaurar mediante el uso de un adhesivo), se aplicaron sobre dos tipos de muestras diferentes. En una primera fase, se testaron sobre papeles

modelo (filtros, hojas de pasta química y hojas de pasta mecánica), para evitar la influencia de cualquier aditivo ajeno al papel. La restauración se efectuó en estos papeles modelo antes y después de ser sometidos a un proceso de envejecimiento acelerado. Posteriormente se llevó a cabo sobre ejemplares reales, es decir, libros antiguos.

Todos los papeles se acondicionaron y, en el caso de los libros, se determinó el tipo de proceso de pasteado mediante microscopía óptica. Se determinaron sus principales características mecánicas, ópticas, superficiales y estructurales. Antes de llevar a cabo los procesos de restauración de los papeles, éstos fueron esterilizados en autoclave. Todo el proceso de restauración se llevó a cabo en condiciones estériles.

2.3.2.- Materiales de refuerzo

La restauración de los documentos se efectuó con celulosa bacteriana y con papel japonés. Se compararon en primer lugar las propiedades de ambos materiales, determinando su gramaje, espesor, resistencia al estallido, resistencia al desgarrar, permeabilidad al aire, ángulo de contacto estático y coordenadas CIELab. La determinación de estas propiedades permitirá entender mejor los resultados una vez que dichos materiales sean utilizados para reforzar las muestras seleccionadas.

2.3.3.- Laminación

La laminación de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de restauración de la Biblioteca Nacional de España. Para ello se comenzó ensayando cinco tipos de adhesivos, y seleccionando uno de ellos en función de sus coordenadas CIELab, blancura, amarilleamiento y resistencia al estallido. Una vez seleccionado el adhesivo adecuado, se efectuó el proceso de laminación sobre libros antiguos, y sobre papeles modelo envejecidos y sin envejecer. Diez hojas de cada muestra se laminaron con celulosa bacteriana y diez con papel japonés. Esto nos permite comparar los resultados obtenidos con ambos materiales y evaluar así la capacidad de la celulosa bacteriana para ser utilizada en el campo de la restauración. Ya que la mejora de las propiedades del

papel mediante la restauración no debe perjudicar a su estabilidad a largo plazo ni modificar su apariencia original, las muestras laminadas fueron caracterizadas también tras un proceso de envejecimiento acelerado.

Las muestras a caracterizar son, por tanto, los papeles modelo (antes y después de ser envejecidos), y los libros antiguos, laminados tanto con celulosa bacteriana como con papel japonés. Asimismo se caracterizaron tras el proceso de envejecimiento posterior a dicha laminación. Previo a su caracterización las muestras se acondicionaron bajo parámetros estándar. Las propiedades que se determinaron en estas muestras, fueron: mecánicas (gramaje, resistencia al estallido y al desgarró), ópticas (blancura, opacidad, amarilleamiento, coordenadas CIELab y brillo especular), estructurales (permeabilidad al aire y morfología mediante microscopía electrónica de barrido), y, por último, superficiales (ángulos de contacto estáticos y dinámicos, perfilometría láser y microscopia óptica para evaluar la influencia de los materiales de refuerzo en la legibilidad de los textos).

2.3.4.- Generación de celulosa bacteriana *in situ*

El siguiente paso fue hacer crecer la celulosa bacteriana directamente sobre el papel a restaurar. Se efectuaron ensayos en cuanto a la concentración del inóculo y el método de aplicación. Al igual que en el caso anterior, se ensayaron los papeles modelo (envejecidos y sin envejecer) y los libros restaurados, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado.

Las propiedades que se determinaron en estas muestras, fueron: mecánicas (gramaje, espesor, resistencia al estallido y al desgarró), ópticas (blancura, opacidad, amarilleamiento, coordenadas CIELab y brillo especular), estructurales (permeabilidad al aire y morfología mediante microscopía electrónica de barrido), y, por último, superficiales (ángulos de contacto estáticos y dinámicos).

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral, enfocados a conseguir los objetivos propuestos, se recogen en una serie de publicaciones que se listan a continuación:

- Santos, S.M., Carbajo, J.M., Villar, J.C. (2013). The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. *Bioresources* 8(3): 3630-3645. (Objetivo1).
- Santos, S.M., Carbajo, J.M., Quintana, E., Ibarra, D., Gómez, N., Ladero, M., Eugenio, M.E., Villar, J.C. (2015). Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. *Carbohydrate Polymers* 116:173-181. (Objetivos 2 y 4).
- Santos, S.M., Carbajo, J.M., Gómez, N., Quintana, E., Ladero, M., Sánchez, A., Chinga-Carrasco, G., Villar, J.C. Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration. PartI: Application on model papers. *Journal of Materials Science*. DOI:10.1007/s10853-015-9476-0. (Objetivos 3 y 4)
- Santos, S.M., Carbajo, J.M., Gómez, N., Quintana, E., Ladero, M., Sánchez, A., Chinga-Carrasco, G., Villar, J.C. Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration. PartII: Application on real samples. *Journal of Materials Science*. DOI:10.1007/s10853-015-9477-z. (Objetivos 3 y 4).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIAL A RESTAURAR

Tanto el procedimiento consistente en generar capas de celulosa bacteriana *a priori* y adherirlas después al papel a restaurar, como aquél en que se hace crecer a la celulosa bacteriana directamente sobre dicho papel, se ensayaron sobre dos tipos de muestras diferentes.

En primer lugar el refuerzo se efectuó sobre papeles modelo para evitar la influencia de cualquier aditivo ajeno a la celulosa. Además, la restauración también se llevó a cabo tras someter a estos papeles modelo a un proceso de envejecimiento acelerado (que se describirá en el capítulo 3), para simular muestras reales. En una segunda etapa, la restauración según ambos métodos se llevó a cabo sobre libros viejos adquiridos en el mercado de segunda mano.

Estos tres tipos de muestra, papeles modelo, papeles modelo envejecidos, y libros, fueron caracterizados en términos de sus principales características mecánicas, ópticas, superficiales y estructurales, según lo descrito en el capítulo 4. Previa a esta caracterización, las muestras se acondicionaron según norma ISO 187:1990 (23°C y 50% de humedad relativa). En el caso de los ejemplares reales se determinó, además, el tipo de proceso de pasteado y su composición fibrosa. Para ello es necesaria la preparación de las fibras y su tinción con reactivo de Herzberg. Estas determinaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio óptico Olympus Vanox AHMT3, y siguiendo las normas UNE 57021-2:1992 y UNE 57021-3:1992.

Papeles modelo

Se seleccionaron tres tipos diferentes de papeles modelo. Como papeles modelo de fibras de alta calidad, libres de lignina, se adquirieron papeles filtro Whatman nº42 (**F**), hechos de linters de algodón. Por otra parte, se fabricaron hojas de laboratorio en un formador de hojas de tipo Rapid-Köeten según la norma ISO 5269-2:2004, de pasta mecánica de conífera 100% (**M**), que contiene la mayor parte de la lignina de la madera, y, de la misma manera, hojas de laboratorio de pasta química también de conífera 100% (**Q**), que ha perdido parte de la lignina original. En ningún caso se realizó encolado,

calandrado ni se añadieron cargas. Las fibras, en los casos de las hojas de laboratorio, se prepararon con un grado de refino entorno a 32° SR según norma ISO 5267-1:1999 (método Schopper-Riegler), utilizando para ello un equipo PFI (ISO 5264-2:2011). Para simular las características del papel real a restaurar, los papeles modelo se sometieron a un proceso de envejecimiento acelerado según norma ISO 5630-3:1996 (filtro envejecido, **F_E**; pasta mecánica envejecida, **M_E**; pasta química envejecida, **Q_E**).

Libros viejos

Como sustrato real para evaluar la calidad de los métodos de restauración propuestos, se adquirieron en el mercado de segunda mano ejemplares sin valor documental, similares a los ejemplares históricos a restaurar. Se contó para ello con el apoyo de la Biblioteca Nacional de España. Inicialmente se adquirieron los siguientes 16 libros representativos:

1. Canción de Navidad, Charles Dickens. Compañía Ibero-Americana de Publicaciones, S.A. Librería Fernando Fe. Ejemplar sin fecha, posiblemente 1925.
2. Historia de la literatura española, J. M. Ruano. Badajoz. Ediciones Arqueros. 1930.
3. Filosofía del derecho, V. Cathrein. Instituto editorial Reus, S.A. 1941.
4. María de Médicis, J.Gil Editor. Ejemplar sin fecha, posiblemente 1943.
5. Cumbres borrascosas, Emily Bronte. Ediciones Reguera. 1944.
6. Manual de Gramática Histórica Española. R. Menéndez Pidal. Espasa-Calpe, S.A. 1944.
7. Le Capitaine Fracasse. Théophile Gautier. Le livre de poche classique. 1961.
8. Catecismo de la doctrina cristiana. Tercer grado. Texto nacional. Comisión episcopal de enseñanza. Madrid. 1962.
9. Hay otros hombres. Luisa María Linares. Editorial Juventud. 1963.
10. El segundo sexo. Simone de Beauvoir. Siglo veinte. 1970.
11. El país de los gigantes. Editorial Bruguera. 1971.
12. Los vikingos. Marcel D'Isard. Editorial Bruguera. 1973.
13. El pecado del mundo. Maxence van der Meersch. Ediciones GP. 1974.
14. Almanaque mundial 1982. Editorial América, S.A. 1981.
15. Historia de Roma. Indro Montanelli. Tribuna de Plaza & Janés. 1988.
16. Relámpagos. Dean R. Koontz. Plaza & Janés. 1992.

De estos 16 ejemplares fueron seleccionados 3, los más significativos según su fecha de edición y su composición fibrosa, a los que llamaremos por simplificar libro₁ (**L₁**), libro₂ (**L₂**) y libro₃ (**L₃**). Esta selección se describe ampliamente en el apartado 3.1 de Resultados y Discusión.

2.- MATERIALES DE REFUERZO

Los materiales con los que se reforzaron las muestras descritas anteriormente, fueron papel japonés y celulosa bacteriana. Comparando los resultados obtenidos con ambos materiales se podrá evaluar la capacidad de la celulosa bacteriana en el campo de la restauración.

2.1.- Papel Japonés

El papel japonés es, como ya se dijo en la Introducción, un material habitualmente utilizado por los restauradores para laminar papeles degradados. Se le conoce también como “washi paper”. Está hecho con fibras muy largas de kozo, gampi, mitsumata, o distintas combinaciones de estas tres típicas plantas japonesas, que proporcionan elevada resistencia con muy bajo gramaje. En concreto el papel japonés utilizado en esta tesis es el denominado Tengucho (Awagami Papers). Sus características son: gramaje 9 g·m⁻², papel blanqueado, 100% de fibras de kozo, sin encolar.

2.2.- Celulosa Bacteriana

2.2.1.- Organismo y mantenimiento

La celulosa que se va a obtener depende, en primer lugar, de la bacteria que la produzca. Por ello, se seleccionó una bacteria cuyas características son alta productividad de celulosa y alta calidad de la celulosa producida. Está ampliamente

descrito en la bibliografía (Nguyen *et al.*, 2008; Yoshinaga *et al.*, 1997; Toyosaki *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1991), que *Gluconacetobacter xylinum* es una de las especies más adecuadas para producir celulosa, tanto por los niveles de producción como por las características de la celulosa que genera. En concreto se seleccionó la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans*, renombrada como *G. sucrofermentans* (Cleenwerck *et al.*, 2010). Es una bacteria Gram-negativa, aerobia estricta, y que produce celulosa a partir de diferentes fuentes de carbono (Ramana *et al.*, 2000).

La cepa utilizada, CECT 7291, se adquirió en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se procedió a su rehidratación, siembra y cultivo según las instrucciones proporcionadas por la CECT. Su conservación se efectuó mediante subcultivo en condiciones estériles, en placas Petri de 90mm de diámetro, con medio HS, cuya composición es: glucosa, 20 g·L⁻¹; extracto de levadura, 5 g·L⁻¹; peptona, 5 g·L⁻¹; fosfato de disodio, 2,7 g·L⁻¹; y ácido cítrico, 1,15 g·L⁻¹ (Hestrin y Schramm, 1954). Para que el medio de cultivo solidificase, se añadió agar en una concentración de 15 g·L⁻¹. Las placas Petri inoculadas con la bacteria se incubaron a 30 °C (Pourramezan *et al.*, 2009), durante 4 días para obtener las colonias bacterianas y, posteriormente, se conservaron a 4 °C. En la figura 21 se puede observar una placa Petri de las características descritas en la que se observan colonias de *G. sucrofermentans*.



Figura 21. Cultivo de *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 en medio HS sólido.

2.2.2.- Obtención del inóculo

Para poder llevar a cabo correctamente los experimentos, se debía tener una suspensión homogénea de células viables de *G. sucrofermentans*. Para ello se hizo crecer el microorganismo en medio sólido HS durante 6 días en placas Petri de 90 mm de diámetro. Se inocularon, con las colonias crecidas, matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio líquido HS, y se cultivaron en condiciones estáticas a 30°C durante 4 días (figura 22).



Figura 22. Cultivo de *G. sucrofermentans* CECT 7291 en condiciones estáticas en matraces Erlenmeyer con medio HS líquido.

Tras ese tiempo, las capas formadas se cortaron en trozos pequeños (alrededor de 1 x 1 cm), y se agitaron con el medio líquido a 700 rpm durante 30 minutos. La suspensión así obtenida se filtró a través de una gasa estéril, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y, tras descartar el sobrenadante, se lavó el pellet con disolución de Ringers (NaCl 2,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl 0,105 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,120 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y NaHCO_3 0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Esta disolución se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones, y el pellet se resuspendió en un volumen pequeño de disolución de Ringers. Se utilizó como inóculo una disolución cuya densidad óptica se ajustaba a unos valores de absorbancia entre

0,59-0,64 a una longitud de onda de 600 nm. Cuando fue necesario se añadió disolución de Ringers al inóculo concentrado hasta obtener dicho valor. Todo el proceso se efectuó en condiciones estériles.

2.2.3.- Producción de celulosa bacteriana

Cada proceso de restauración propuesto necesita que la celulosa bacteriana sea generada con un método de cultivo diferente. Para el primero de ellos es necesario disponer de capas de celulosa bacteriana que luego se unirán, con la ayuda de un adhesivo, al material a restaurar. En el segundo método descrito, la celulosa bacteriana crecerá directamente sobre el papel a restaurar, sin necesidad de que las capas se generen previamente.

2.2.3.1.- Capas de celulosa bacteriana

Las láminas de celulosa bacteriana se generaron de la siguiente manera: 100 mL del medio de cultivo líquido, sin agar, se añadieron a placas Petri de 150 mm de diámetro, se inocularon con 250 µL de la suspensión descrita en el apartado 2.2.2, y se cultivaron a 30 °C en condiciones estáticas. Puesto que lo que se necesitaba eran capas, se fijó para obtenerlas un método de cultivo estático. La temperatura seleccionada para el cultivo fueron 30 °C. En todos los casos ensayados el pH inicial del medio de cultivo se mantenía en valores entre 5,8 y 6,4, adecuados para la producción de celulosa bacteriana, tal y como se explicó en la Introducción de esta tesis, por lo que se decidió no efectuar ninguna modificación sobre él.

En la figura 23 se pueden ver láminas de celulosa bacteriana generadas de la manera descrita, en placas Petri en cultivo estático.

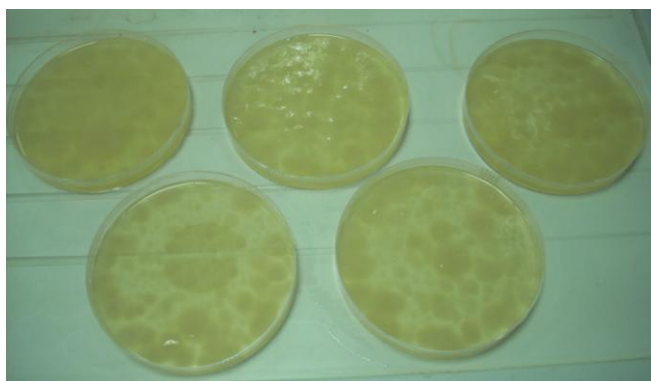


Figura 23. Placas Petri con capas de celulosa bacteriana generada por *G. sucrofermentans* CECT 7291 tras su cultivo en medio HS.

Partiendo del medio de cultivo HS, se seleccionaron las fuentes de carbono y nitrógeno que generaron la celulosa bacteriana con las características más adecuadas para su posible uso en restauración. También se evaluó el efecto de la adición de un 1% de etanol al medio seleccionado. En primer lugar se seleccionó la fuente de carbono que proporcione una celulosa con las características buscadas. Para ello se preparó el medio HS variando las fuentes de carbono, según bibliografía (Keshk y Sameshima, 2005; Bielecki *et al.*, 2002; Ramana *et al.*, 2000), a una concentración de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$:

- Glucosa
- Fructosa
- Sacarosa
- Manitol
- Glicerol

Para seleccionar la fuente de nitrógeno, el medio HS se preparó con la mejor fuente de carbono encontrada en esta etapa. Las dos fuentes de nitrógeno del medio HS original (peptona y extracto de levadura) son fuentes de nitrógeno orgánico complejas. Se sustituyeron, sucesivamente, por otras fuentes de nitrógeno, que se añadieron en la misma concentración que en el medio HS original, esto es, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ cada una.

- Fuentes de nitrógeno orgánico:
 - Simple: asparagina

- Compleja: extracto de maíz (corn steep liquor: CSL)
- Fuentes de nitrógeno inorgánico:
 - Amoniacal: sulfato de amonio
 - Nítrica: nitrato de potasio y nitrato de amonio

En todos los casos se mantuvo una de las dos fuentes de nitrógeno del medio HS original, resultando, por tanto, las siguientes combinaciones de fuentes de nitrógeno:

- peptona-asparagina
- extracto de levadura-asparagina
- peptona-nitrato de potasio
- extracto de levadura-nitrato de potasio
- peptona-sulfato de amonio
- extracto de levadura-sulfato de amonio
- peptona-CSL
- extracto de levadura-CSL

Para evaluar el efecto del etanol, éste se añadió al medio de cultivo optimizado, siendo previamente esterilizado a través de un filtro de 0,22 μm de poro. El cultivo se efectuó en todos los casos en condiciones estériles, y se mantuvo a 30 °C durante 4, 7, 10 y 13 días

2.2.3.2.- Generación de celulosa bacteriana *in situ*

Con este método lo que se pretende es que la celulosa bacteriana se vaya anclando a la celulosa vegetal del papel a restaurar a medida que va siendo excretada por la bacteria. Para ello, el inóculo ha de ser añadido, junto con el medio de cultivo, directamente sobre la muestra a restaurar. Para obtener el inóculo se parte de la placa sólida conservada en el frigorífico, y se procede según lo descrito en el apartado 2.2.2.

Se ensayaron distintos métodos de aplicación a la misma concentración que la utilizada para obtener capas de celulosa bacteriana, esto es, 250 μL de inóculo en 100 mL finales de medio de cultivo HS optimizado con las fuentes de carbono y nitrógeno

seleccionadas anteriormente. Los diferentes métodos de aplicación se ensayaron sobre papel de pasta mecánica, que al conservar la práctica totalidad de la lignina puede ser la muestra más difícil de restaurar. Este papel se esterilizó en autoclave, y los ensayos fueron llevados a cabo en condiciones estériles, utilizando una cabina de flujo laminar. Los métodos de aplicación ensayados, en condiciones estériles, se describen someramente a continuación:

- 1.- Por capilaridad. Un extremo del papel a restaurar se introducía en un matraz Falcon de 50 mL que contenía el medio de cultivo optimizado con el inóculo.
- 2.- Por inmersión del papel a restaurar en placa Petri de 90 mm que contenía el medio de cultivo optimizado al que se le había añadido el inóculo.
- 3.- Por contacto con el medio de cultivo optimizado al que se le habían añadido 15 g.L⁻¹ de agar, es decir, en estado sólido. Se ensayaron dos variantes, en la primera de ellas se añadió el inóculo al medio de cultivo sólido, depositando encima el papel a restaurar. En la segunda variante el papel a restaurar se situó entre el medio de cultivo sólido y el inóculo. Este ensayo se efectuó en placas Petri de 90 mm.
- 4.- Por contacto con medio semisólido. En este caso el proceso seguido fue el mismo que en el punto anterior, pero el agar se añadió en una concentración de 5 g.L⁻¹ al medio de cultivo optimizado. Al igual que en los casos anteriores, este ensayo se efectuó en placas Petri de 90 mm.
- 5.- Aplicación con pulverizador. El medio de cultivo optimizado, junto con el inóculo, se añadió sobre el papel a restaurar con un pulverizador previamente esterilizado en autoclave.
- 6.- Aplicación con pincel. El inóculo, junto con el medio de cultivo optimizado, se aplicó sobre el papel a restaurar con un pincel previamente esterilizado en autoclave.
- 7.- Control. En todos los casos se estableció un procedimiento control en el que se seguían los mismos protocolos de los procedimientos del 1 al 6, pero sin la existencia de inóculo, sólo con medio de cultivo, para comprobar la bondad del método.

El cultivo se efectuó en todos los casos dentro de placas Petri cerradas en condiciones estériles, y se mantuvo dicho cultivo en condiciones estáticas a 30°C durante

7 días. En el caso de la aplicación con pulverizador y con pincel se mantuvieron las muestras con y sin cámara húmeda, y con y sin una aplicación de medio de cultivo a los 3 días para evitar que se secase.

Con el método de aplicación seleccionado se ensayaron distintas concentraciones del inóculo en el medio de cultivo optimizado: $250\mu\text{L}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$; $5\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$; $15\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$; $25\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$; y $50\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$.

Una vez seleccionados el método de aplicación y la concentración del inóculo, éstos se emplearon en todos los materiales a reforzar contemplados en la presente tesis, es decir, papeles modelo envejecidos y sin envejecer, y libros antiguos.

2.2.4.- Métodos de purificación de la celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana producida contiene impurezas tales como restos del medio de cultivo utilizado y células bacterianas. Antes de ser utilizada, estas impurezas deben ser eliminadas mediante un proceso de purificación. El método más ampliamente utilizado en la bibliografía consultada, es un tratamiento alcalino (Sokolnicki *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2006; Duvey *et al.*, 2005; Yamanaka *et al.*, 1989). Sin embargo, este tratamiento podría dañar al documento a reforzar cuando la capa de celulosa se genere directamente en su superficie, por lo que, para este caso, es necesario buscar un método alternativo que purifique la celulosa bacteriana sin dañar al soporte.

2.2.4.1.- Método alcalino

Tras un primer lavado con agua destilada, las capas de celulosa bacteriana generadas según lo descrito en el apartado 2.2.3.1, se incuban a 90°C durante 60 minutos en una disolución de NaOH al 1%. Tras ese tratamiento alcalino, que causa la lisis celular, las capas se lavan abundantemente con agua destilada para arrastrar las células bacterianas y los restos de medio de cultivo. Este proceso de purificación concluye con el secado de los films de celulosa, que se lleva a cabo mediante filtración

en un embudo Büchner de diámetro adecuado con un papel filtro de velocidad media (PRAT DUMAS A150600), seguido de un secado al aire. Se ensayó también este mismo proceso utilizando Na_2CO_3 como agente alcalino, para comparar su eficacia. En ambos casos se reservaron algunas capas de CB a las que sólo se lavó con agua destilada como control.

2.2.4.2.- Otros métodos

Para seleccionar un método de purificación adecuado a la generación de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar, se efectuaron varios ensayos previos. Se reservaron algunas capas de CB como control, a las que no se efectuó purificación.

En todos los casos, después de los tratamientos que se especifican a continuación, y también en el caso de los controles, se lavaron las capas de celulosa de dos maneras distintas: sólo con agua destilada, o con una disolución de cloruro de sodio al 5% seguida de un lavado con agua destilada. Las capas se secaron, al igual que con los tratamientos alcalinos, mediante filtración en un embudo Büchner con un papel filtro de velocidad media (PRAT DUMAS A150600), tras lo cual se dejaron secar al aire.

La eficacia de los métodos de purificación se comprobó mediante el cultivo de un fragmento del material restaurado en placa Petri con medio HS sólido. El cultivo se efectuó en condiciones estáticas a 30°C.

Anaerobiosis

Dado que *G. sucrofermentans* es una bacteria aerobia, se le sometió a una atmósfera anaerobia para impedir su supervivencia. Esta atmósfera se generó en una cámara de anaerobiosis con sobres GENbox anaer (Biomerieux), siendo el principio básico de este método la eliminación del oxígeno presente en dicha cámara. Las condiciones anaeróbicas se controlaron mediante un indicador de óxido-reducción formado por un soporte de plástico provisto en la extremidad de una parte activa azul. Esta parte está impregnada de un colorante (azul de metileno) y de un agente reductor. La forma oxidada de azul de metileno es transformada en ausencia de oxígeno en una

leucobase reducida (incolora). En presencia de oxígeno la leucobase reducida vuelve a la forma oxidada (azul). Las capas de celulosa bacteriana se incubaron en estas condiciones a 30° C de temperatura durante 10 minutos.

Tratamiento antibiótico

La ampicilina es un antibiótico betalactámico que ha sido extensamente utilizado para tratar infecciones bacterianas. Es la primera penicilina semisintética, su desarrollo, por F.P. Doyle, J.H.C. Nayler y Harry Smith (1959-1961), se debe a la búsqueda de derivados de la penicilina de mayor espectro por la aparición de cepas resistentes. Es capaz de penetrar en las bacterias interfiriendo con la síntesis de la pared celular durante la replicación. La ampicilina es bactericida tanto para bacterias Gram positivas como para bacterias Gram negativas. Las capas de CB se mantuvieron 30 minutos sumergidas en una disolución de ampicilina con una concentración de 200 µg.mL⁻¹.

Tratamiento térmico

Los métodos térmicos de esterilización son comúnmente los más utilizados para eliminar los microorganismos, incluyendo las formas más resistentes como son las endoesporas. De Ory et al. (2004) y (1998) observaron que cuando la temperatura es superior a 33 °C, las bacterias acéticas sufren un proceso de desactivación bacteriana, en el que las enzimas son desnaturalizadas y se daña la membrana celular, causando que los constituyentes se dispersen. Para el ensayo de esta tesis las capas de CB se mantuvieron 1 hora a una temperatura de 65 °C.

3.- PROCESO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO

Una de las características fundamentales de la restauración es que tiene que ser estable en el tiempo. Para evaluar el comportamiento de los materiales con el tiempo se efectuó, cuando fue necesario, un proceso de envejecimiento acelerado a 80 °C y 65% de humedad relativa durante 144 horas, según norma ISO 5630-3:1996.

4.- MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

Las propiedades ópticas, mecánicas, superficiales y estructurales, determinan las características de un papel y, por tanto, sus posibles aplicaciones. Antes de efectuar cualquiera de los ensayos que se detallan a continuación, las muestras se acondicionaron según norma ISO 187:1990, es decir, a 23 °C de temperatura y 50% de humedad relativa, durante al menos 12 horas.

4.1.- Caracterización del medio residual

En los ensayos de optimización del medio de cultivo se determinó, en cada condición y tiempo, el pH y la concentración de fuente de carbono residual. El pH se determinó utilizando un pH-metro Crison GLP22+ equipado con un electrodo combinado convencional. Para determinar la concentración de fuente de carbono se utilizaron kits específicos proporcionados por Megazyme, fundamentados en reacciones enzimáticas acopladas que se basan en la producción/consumo de los cofactores NAD⁺/NADH o NADP⁺/NADPH, y que se evalúa mediante la variación de la absorbancia a 340nm.

4.2.- Propiedades físico-mecánicas

El papel muestra atributos mecánicos que le permiten soportar los esfuerzos a los que se ve sometido durante su uso. También determinan en gran medida su durabilidad.

4.2.1.- Gramaje

Para determinar el gramaje se utilizó una balanza analítica de precisión. El gramaje se define como la masa por unidad de superficie, expresado en gramos por metro cuadrado. La determinación del gramaje se efectuó según la norma ISO 536:2012.

4.2.2.- Espesor

Se define como la distancia entre las dos caras del material, determinada bajo una carga estática aplicada. Esta distancia se calculó introduciendo la muestra a medir entre los palpadores de un micrómetro de hoja. Se determina según la norma ISO 534:2011.

4.2.3.- Resistencia mecánica

La resistencia mecánica de un material es la carga que puede soportar antes de ser estallado o desgarrado. Durante la formación de una hoja de papel, las fibras vegetales tienden a orientarse en el sentido de avance de la máquina formadora, por ello encontramos dos direcciones en las hojas: dirección máquina o longitudinal, y dirección transversal. Esto no sucede en el caso de una hoja generada en un formador de laboratorio ni en una hoja de celulosa bacteriana, con lo que, en estos casos, no se distinguen direcciones longitudinal y transversal. La resistencia al estallido es independiente de la dirección de la fibra, no así la resistencia al desgarro, que es mayor en el sentido transversal de un papel que en el sentido longitudinal del mismo. En esta tesis los ensayos de resistencia al desgarro se efectuaron en el sentido transversal del papel.

La **resistencia al estallido** es la presión máxima que, aplicada perpendicularmente a su superficie, soporta una probeta de papel, expresada en kilopascales (kPa). Se determina según la norma ISO 2758:2014, con un equipo Messmer & Büchel. La probeta se coloca sobre un diafragma circular elástico que la sujeta firmemente por la periferia. El equipo bombea, a velocidad constante, un fluido hidráulico, combando dicho diafragma hasta que se rompe la probeta. El máximo valor de presión hidráulica aplicada es la resistencia al estallido. El índice de estallido es la relación existente entre la resistencia al estallido del papel y su gramaje ($\text{kPa} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

La **resistencia al desgarro** es la fuerza media requerida para continuar el desgarro efectuado en un papel sobre un corte inicial, expresado en milinewtons (mN). El ensayo, según norma ISO 1974:2012, consiste en desgarrar una probeta de dimensiones

definidas (50 ± 2 mm x 43 ± 0.5 mm) formada por varias hojas, normalmente 4, en la que previamente se ha efectuado un corte inicial a lo largo de una distancia fija. El desgarro se produce mediante el péndulo del equipo (equipo de desgarro de Messmer & Büchel), que se desplaza en un plano perpendicular al plano inicial de la probeta. El índice de desgarro se define como la resistencia al desgarro dividido entre su gramaje, expresado en milinewtons metro cuadrado por gramo ($\text{mN} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

4.2.4.- Resistencia de adhesión interna

Este ensayo, también llamado método Scott Bond (TAPPI T569), indica la resistencia que muestra un papel a ser deslaminado. El método es adecuado tanto para papel y cartón de una sola capa, como para papel de múltiples capas, incluyendo hojas revestidas y las que se laminan con películas poliméricas. El método requiere el uso de una cinta adhesiva de doble cara para la adherencia de ambas caras del papel. La rotura se inicia por el impacto de un péndulo que tiene una masa y una velocidad controladas, que hace que la hoja se divida. Mide, por tanto, la energía necesaria para deslaminar dicho papel.

4.3.- Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas que se ensayaron, determinan las características intrínsecas de la celulosa: su pH, su grado de polimerización, su cristalinidad y su composición.

4.3.1.- Medida del pH

En los ensayos de optimización del medio de cultivo, se midió el pH superficial de las capas de celulosa bacteriana generadas. Esta medida se efectuó, en cada condición y tiempo, sobre las capas de celulosa bacteriana tanto antes como después de lavarlas

exhaustivamente con agua destilada. Esta medida se efectuó con un pH-metro Crison GLP22+ equipado con un electrodo de superficie.

4.3.2.- Viscosidad

La viscosidad proporciona una medida del grado de polimerización de la celulosa. Este método se utilizó para determinar la viscosidad de la celulosa bacteriana, para ello se disolvió ésta en cuprietilendiamina según el procedimiento descrito en la norma ISO 5351:2010. La principal variación con respecto a dicha norma es que en nuestro caso la celulosa bacteriana se disolvió directamente en una disolución de cuprietilendiamina, sin ser previamente desintegrada en agua, debido a las dificultades que esto presentaba.

4.3.3.- Difracción de rayos-X

La cristalinidad de la celulosa bacteriana se estudió utilizando la difracción de rayos-X, usando un difractómetro multipropósito PANalytical modelo X'Pert MPD. Este instrumento está equipado con un tubo de cobre de rayos-X y dos goniómetros en configuración vertical θ - 2θ , con óptica Bragg-Brentano (rendijas fijas, monocromador secundario curvo y detector proporcional sellado de Xe). Uno de los goniómetros tiene una plataforma portamuestras multi-propósito, que permite medir sobre muestras de hasta 1 kg de peso y dimensiones 10cm x 10cm x 10cm. La plataforma portamuestras del segundo goniómetro es un dispositivo de rotación de muestras ("spinner") asociado a un cambiador automático de muestras de 21 posiciones. El difractómetro se dedica al análisis de fases, estudiándose en nuestro caso el intervalo angular $2\theta = 5-40^\circ$. Los índices de cristalinidad para las muestras de celulosa bacteriana se calculan en cada caso usando la siguiente ecuación (Retegi *et al.*, 2010):

$$Cristalinidad(\%) = \frac{I_{200} - I_{2\theta=18^\circ}}{I_{200}}$$

Siendo $I_{2\theta=18^\circ}$ la intensidad del pico cristalino en el mínimo a $2\theta=18^\circ$, y siendo I_{200} la intensidad del pico cristalino en el máximo a 2θ entre 20 y 23° .

4.3.4.- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización de la CB en cuanto a su composición se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Con este ensayo se pudo evaluar la eficacia de los métodos de purificación empleados, ya que permite detectar señales procedentes, tanto de la celulosa, como de otros componentes (proteínas, etc). La espectroscopía de infrarrojo en la región media del espectro ($4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$) permite identificar los modos de vibración característicos de cada molécula y cuantificar la concentración de los distintos componentes de una muestra, ya que la absorbancia de las bandas características de cada sustancia guarda relación con su concentración (ley de Lambert Beer). Las bandas de absorción en la región del espectro infrarrojo, entre 4000 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} , se asocian únicamente a un grupo funcional y a la estructura molecular completa. Mientras que en la región entre 1300 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , conocida como “huella dactilar”, la asignación de grupos funcionales determinados es más difícil debido a la multiplicidad de bandas, pero esta zona resulta muy útil para la identificación de compuestos específicos.

El equipo usado fue un espectrofotómetro Jasco FTIR-4600, equipado con un accesorio de diamante de reflexión única. Se configuró con una resolución de 2 cm^{-1} , efectuándose 100 escáneres en la región del espectro de 4000 a 650 cm^{-1} .

4.4.- Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de un papel son de gran importancia por su influencia en el impacto perceptivo. La sensación de blancura, brillo y color que experimenta un observador depende del tipo de luz que lo ilumina, de las propiedades de dispersión y absorción de luz del papel y de la sensibilidad del ojo a las diferentes longitudes de onda

(Hubbe *et al.*, 2008; Vaarsalo, 2000). Se determinan a partir de los factores de reflectancia, que son el ratio entre la radiación reflejada por el objeto y la reflejada por el difusor perfecto bajo las mismas condiciones de medida. Se suelen expresar en porcentajes. Existen varias fuentes luminosas normalizadas para determinar las propiedades ópticas del papel. El iluminante C se denomina ISO y está estandarizado por la Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale d'Éclairage, CIE). El espectro de emisión que tiene es similar a la luz diurna. Para obtener blancura, amarilleamiento, opacidad y coordenadas CIELab en los ensayos de esta tesis, se utilizó un reflectómetro Elrepho 070 de Lorentze & Wettre.

4.4.1.- Blancura

La blancura ISO se define como el factor de reflectancia difusa medido a una longitud de onda efectiva de 457 nm, expresada en tanto por ciento. Se determina según la norma ISO 2470-1:2009. Este valor se determina en la zona del espectro visible correspondiente al azul, ya que el ojo humano percibe un ligero tono azulado como una sensación de mayor blancura. La blancura ISO se expresa en una escala absoluta en la que al negro se le asigna el valor 0% y al difusor perfecto el 100%.

4.4.2.- Amarilleamiento

El valor del amarilleamiento (SCAN-G 5:2003) indica en qué grado se desvía el color de un papel desde el punto acromático hacia el amarillo. Este dato se utiliza con frecuencia para evaluar los cambios de color en un material causados por la exposición a agentes externos (luz, calor, humedad...).

4.4.3.- Opacidad

La opacidad es la medida de la capacidad de una hoja de papel para no dejar traspasar la luz. La opacidad (ISO 2471:2008) se define como la relación entre el factor

de reflectancia luminosa de una sola hoja de papel sobre fondo negro, y el factor de reflectancia de un conjunto de hojas de un espesor tal que sea opaco.

4.4.4.- Coordenadas CIELab

Existen varios sistemas colorimétricos para expresar el color, pero el más empleado por la industria papelera es el sistema CIELab. Se trata de un espacio tridimensional de color, recomendado por la CIE en 1976. Es una esfera con sus respectivas coordenadas cartesianas o polares, que definen una posición en el espacio única para cada color. El valor de L^* es una medida de la luminosidad que va desde el valor 0, correspondiente al negro puro, hasta el 100, el blanco puro. El valor de a^* es la coordenada en el eje rojo/verde, y el valor de b^* en el eje amarillo/azul. Un valor positivo de a^* significa un matiz rojo, y un valor negativo, verde. Análogamente, un valor negativo de b^* significa la presencia de un componente azul, y un valor positivo, amarillo. Las coordenadas son adimensionales y se determinan según norma ISO 5631-1:2009.

4.4.5.- Brillo especular

Esta propiedad hace referencia al porcentaje de reflexión de la luz especular. Un haz convergente, regular y difuso, se refleja en la superficie del soporte en un ángulo igual y opuesto al del rayo incidente. La Norma ISO 8254-1:1999 especifica un método para la medida del brillo especular a un ángulo de 75° respecto a la normal a la superficie del papel. Se utilizó un brillómetro Hunter Lab para efectuar las medidas de esta tesis.

4.5.- Propiedades superficiales

Las propiedades superficiales de un papel se refieren, fundamentalmente, a su relieve y a la naturaleza de su superficie.

4.5.1.- Ángulos de contacto

Aunque la caracterización de la energía libre de superficie de un papel es compleja, Shen *et al.*, (2000) recomienda, como método más adecuado, la determinación del ángulo de contacto entre ella y una gota de líquido. Se pueden encontrar muchos estudios sobre los fundamentos de este método (Chibowski, 2003; Shen *et al.*, 2000; Owens y Wendt, 1969). Cuando inicialmente la gota se deposita en la superficie, la interacción entre ambos materiales puede ser caracterizada por un ángulo de contacto estático (α). La evolución en el tiempo de este ángulo estático, denominada ángulo de contacto dinámico (α_d), se deberá a la dispersión del líquido en la superficie del papel y/o a la absorción del mismo por la estructura fibrosa. La medición de los ángulos de contacto se efectúa según norma T 458 cm-04. La influencia de la topografía de la superficie de la hoja en el ángulo de contacto es ampliamente conocida (Ferreira *et al.*, 2008, Swain y Lopowsky, 1998). Un aumento de la rugosidad del papel se traduce en que el ángulo de contacto medido es cada vez mayor.

En esta tesis el líquido utilizado, tanto para obtener los ángulos de contacto estáticos como los dinámicos, fue agua. Las medidas se realizaron en un Data Physics Instrument OCA 15 plus, con un software SCA 20/21 y usando el método de la gota sésil. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD inmediatamente después de que la gota se depositara en la superficie del material a medir. El ángulo de contacto estático correspondiente se calcula tras fijar numéricamente la línea de contorno de gota, usando el método de Young-Laplace. En todos los casos se analizaron 20 gotas de agua destilada, aplicando el menor volumen de gota posible (2 μL).

Para el estudio de caracterización de capas de CB, los ángulos de contacto dinámicos se analizaron mediante cinco videos que registraron la evolución de la gota durante 60 segundos, tomando 1 imagen por segundo, aplicando gotas de 2 μL . Para cuantificar las posibles diferencias en la evolución de los ángulos de contacto, se calculó la tasa de mojado para cada muestra, mediante la siguiente ecuación, despreciando los cinco primeros segundos ya que las gotas sólo fueron estables tras este tiempo:

$$Tasa\ de\ mojado\ (^{\circ} / s) = \frac{\alpha_5 - \alpha_t}{t - 5}$$

Para las muestras reforzadas mediante laminación, los ángulos de contacto dinámicos se midieron con las siguientes especificaciones:

- En el caso de los papeles modelo laminados, al no tener ningún tratamiento añadido, la gota se absorbía rápidamente. En este caso ocho vídeos registraron la distribución de la gota en la superficie del papel durante un tiempo mínimo de 5 segundos, tomando 25 imágenes por segundo, utilizando gotas de 2 μ L. El cálculo de la tasa de mojado fue entonces el siguiente:

$$\bullet\ Tasa\ de\ mojado\ (\% / s) = \frac{\alpha_0 - \alpha_t}{t} \cdot 100$$

donde α_0 es el valor correspondiente para el α normalizado a tiempo 0. Los ángulos se normalizaron para poder efectuar la comparativa entre la celulosa bacteriana y el papel japonés, ya que su comportamiento era muy distinto. Al normalizar las tasas su valor se expresa en tanto por ciento.

- En el caso de los libros, ocho videos registraron la distribución de la gota en la superficie del papel durante un tiempo de 300 segundos, tomando 2 imágenes por segundo, utilizando también gotas de 2 μ L.

En el caso de la generación in situ, ocho videos registraron la distribución de la gota en la superficie del papel durante un tiempo mínimo de 20 segundos, tomando 5 imágenes por segundo, utilizando también gotas de 2 μ L.

4.5.2.- Microscopía óptica

Para evaluar la influencia de los materiales de refuerzo en la legibilidad de los libros, las muestras se observaron mediante microscopía óptica. En concreto, para observar los textos se utilizaron un microscopio estereoscópico, SZH10, a 20 y 60

aumentos, y un microscopio binocular Olympus Vanox AHMT3 con luz incidente a 100 aumentos. Las microfotografías se tomaron con una cámara digital acoplada al equipo. El microscopio óptico también se utilizó para determinar el tipo de proceso de pasteado y la composición fibrosa de los libros adquiridos para ser reforzados, como ya se explicó en el capítulo 1.

4.5.3.- Perfilometría láser

En la caracterización de la topografía de la superficie del papel, es muy habitual emplear el término rugosidad para indicar si hay mucha diferencia de cota entre los picos y los valles de la superficie del mismo. En función de este parámetro, Kajanto *et al.* (1998) catalogan la rugosidad del papel en:

- Macro-rugosidad, cuando las diferencias entre crestas y valles oscilan entre 0,1 y 1 mm, estas diferencias se deben a la formación de la hoja y a la distribución en el plano de diferentes partículas visibles, como los paquetes de fibras
- Micro-rugosidad, diferencias entre 1 μm y 100 μm , aparece fundamentalmente por la diferencia de forma y posición de las fibras y finos en la estructura del papel
- Rugosidad óptica, diferencias de menos de 1 μm , relacionada con propiedades superficiales de una partícula, de una carga o pigmento individual, o de la naturaleza superficial de la fibra.

Existe una gran variedad de métodos empleados para evaluar la topografía de un papel. Los denominados métodos directos obtienen una representación más o menos exacta de la superficie del mismo, mientras que los métodos indirectos se basan en la fuga de aire entre la superficie del papel y una corona circular situada con una determinada presión sobre él.

La perfilometría láser o LP (Chinga-Carrasco *et al.*, 2003, Brindley *et al.*, 1997) ha sido utilizada para obtener mapas topográficos de la superficie del papel. En esta tesis las muestras de 10 mm x 10 mm fueron recubiertas con una capa de oro para los análisis de perfilometría láser (Lehmann, Lehman Mess-Systeme AG, Baden-Dättwil, Germany). El perfilómetro láser es un equipo basado en la medida de distancias por medio de láser,

que registra los perfiles superficiales y permite tener datos de la rugosidad de dicha superficie. Se tomaron diez imágenes topográficas LP para cada muestra. Las resoluciones lateral y z del sistema LP fueron respectivamente $1\mu\text{m}$ y 10 nm . El tamaño de las áreas locales era $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$. Las superficies fueron niveladas horizontalmente. Se cuantificó también la microrrugosidad superficial como una función de la longitud de onda.

4.6.- Propiedades estructurales

Las propiedades estructurales de un papel son aquellas que vienen determinadas por la estructura del mismo, por ejemplo, su capacidad para permitir que el aire o los líquidos pasen a su través.

4.6.1.- Porosidad Gurley

Para evaluar la estructura porosa del papel se suelen emplear métodos indirectos basados en la determinación de la permeabilidad al aire. Ésta se define como el caudal medio de aire que pasa a través de la unidad de superficie de papel por unidad de presión y tiempo, expresándose en micrómetros por pascal por segundo $\mu\text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s})^{-1}$. Como estas unidades resultan complejas, en la industria papelera es habitual utilizar como resultado el valor obtenido directamente del equipo de ensayo.

En esta parte de la tesis se utilizó un porosímetro Gurley que proporciona el tiempo, en segundos, que 100 cm^3 de aire tardan en atravesar una hoja de papel. El método se efectuó según norma ISO 5636-5:2013. Las ventajas de este ensayo son la rapidez y la sencillez. En la industria del papel se considera que muestras con valores de porosidad Gurley superiores a 900 segundos son totalmente impermeables al aire, y que, por el contrario, muestras con valores inferiores a 5 segundos no oponen ninguna resistencia al paso del aire, siendo consideradas como totalmente permeables.

4.6.2.- Porosimetría por intrusión de mercurio

La porosimetría por intrusión de mercurio se usa para caracterizar la estructura porosa de papeles de impresión y escritura (Moura *et al.*, 2005; Moutinho *et al.*, 2004). Se basa en que el mercurio es un líquido que no moja los sólidos con los que entra en contacto. Así, el mercurio sólo penetrará en los poros del papel si es forzado mediante el incremento progresivo de la presión, de tal manera que cuanto más pequeño sea el diámetro de poro, mayor será la presión que haya que hacer para forzar al mercurio a penetrar en él. El volumen de mercurio absorbido para cada incremento de presión, indica el volumen de poros de la muestra con un determinado diámetro de acceso.

Para obtener los datos de esta tesis se utilizó un Porosímetro 9320 de Micromeritics. La curva de distribución de tamaño de poros se obtiene representando los volúmenes diferenciales de mercurio embebidos a una determinada presión, frente el diámetro medio de poro. Así, el volumen de los poros en un rango de diámetros específico es proporcional al área bajo la curva.

4.6.3.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía ha sido ampliamente empleada para obtener una representación topográfica de la superficie del papel. La microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) permite además obtener información de la manera en que se unen las fibras del material de refuerzo, ya sea papel japonés o celulosa bacteriana, con las fibras del papel que está restaurando. Se utilizó en esta tesis un JEOL JSM 6335 F (figura 24) a 1kV (con una resolución máxima de 5 nm) para evitar la degradación de las muestras por el haz de electrones durante la observación SEM. Las muestras fueron previamente crio fracturadas tras ser sumergidas en nitrógeno líquido, metalizadas con oro durante tres minutos y conservadas durante 16-18 horas a 50°C en una estufa de vacío (20 mmHg) para evitar la presencia de agua en las muestras, antes de comenzar con las observaciones SEM.



Figura 24. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6335 F

5.- MÉTODOS DE RESTAURACIÓN

5.1.- Laminación

Recordemos que laminación es un término general con el que se designa la fusión de capas de distintos materiales. En el contexto de la restauración documental la laminación se refiere específicamente al proceso de fortalecer una hoja con otros materiales más fuertes. En esta tesis los materiales de refuerzo, papel japonés y celulosa bacteriana, han de unirse a las muestras con la ayuda de un adhesivo. Esta unión debe optimizarse teniendo en cuenta la integridad del papel soporte (el método de unión no debe dañarlo).

5.1.1.- Preparación del adhesivo

Tanto la preparación de los adhesivos como el proceso de laminación se llevaron a cabo en el laboratorio de restauración de la Biblioteca Nacional de España. Se ensayaron los siguientes tipos de adhesivos:

1.- Termofundente:

- Archi-BOND (Metilmetacrilato, Etilmetacrilato). El producto comercial se suministra en forma de película entre dos láminas de papel siliconado.

2.- Aplicación fría

- Tylosa MH 4.000 al 2,6% y Tylosa MH 300 al 2,6% (Metilhidroxietil celulosa). El producto comercial se suministra en polvo. La numeración se refiere al grado de polimerización, obteniéndose preparaciones más densas en los grados mayores con la misma proporción de agua. La Tylosa se diluye en una pequeña parte de agua a 90°C y se agita enérgicamente con una varilla de cristal hasta lograr una mezcla homogénea y densa. Finalmente se añade el resto de agua enfriada a 5°C agitándolo continuamente hasta su dilución completa.
- Gelatina 80 Blooms al 3% (Gelatina animal de extracción ácida de calidad alimentaria). El producto comercial se suministra en forma de cristales de color amarillento. En agua a 80°C se disuelve la gelatina con ayuda de un agitador magnético calefactado, con una velocidad de rotación de 700 rpm durante 5 minutos.
- Almidón de trigo. El almidón utilizado es un producto comercial University Products ref. L615-1002. Se prepara en una proporción de 1 a 3 volúmenes de agua. Se deja reposar y, tras 24 horas, se elimina el agua y se sustituye por agua limpia, repitiendo este proceso otras dos veces. Posteriormente se cuece el almidón en microondas a potencia máxima (1000 W) hasta que forme un gel prácticamente transparente (400 cc de almidón requieren 4 minutos de cocción). Se deja reposar hasta que se enfría, formando una pasta que es necesario romper haciéndola pasar tres veces por un tamiz de crin de caballo. Finalmente se diluye en agua hasta el triple de su volumen batiendo con una brocha hasta lograr la consistencia correcta (figura 25).



Figura 25. Tamizado y dilución del almidón de trigo.

5.1.2.- Proceso de laminación

Para evaluar la eficacia de los adhesivos seleccionados, éstos se ensayaron sobre papel de pasta mecánica, que al conservar la práctica totalidad de la lignina, puede ser la muestra más difícil de restaurar. Como materiales de refuerzo se utilizaron tanto láminas de celulosa bacteriana como papel japonés. Una vez reforzadas las hojas de pasta mecánica se obtuvieron sus coordenadas CIELab, su blancura, su amarilleamiento y su resistencia al estallido. La aplicación de los adhesivos a las hojas de pasta mecánicas se efectuó tal y como se describe a continuación.

La aplicación del adhesivo termofundente comenzó separando el papel siliconado y colocando la película de Archi-BOND entre el documento y el papel de refuerzo. Se mantuvo durante 5 minutos a 80°C en un dispositivo que combina vacío y calor. Las dos hojas se adhieren por la fusión del polímero.

La aplicación del resto de los adhesivos ensayados, los adhesivos de aplicación en frío, se efectuó siguiendo el método tradicional japonés. Sobre una mesa de madera se coloca una lámina de tejido no tejido Reemay. Sobre este tejido se coloca el material a restaurar y se hidrata con agua finamente pulverizada, tras lo cual se aplica el adhesivo sobre el material de refuerzo. El papel de refuerzo es entonces colocado sobre la hoja a reforzar mediante una brocha de fibras de palma, que sirve para alisar el papel de refuerzo y eliminar posibles arrugas. Después la hoja reforzada se golpea con una brocha Uchibake para eliminar burbujas. Finalmente el material reforzado se deja secar al aire.

El proceso de laminado utilizando almidón de trigo como adhesivo y celulosa bacteriana y papel japonés como papeles de refuerzo, puede verse en la sucesión de imágenes de la figura 26.

a)



b)



Figura 26. Proceso de laminación: **a)** laminación con celulosa bacteriana, **b)** laminación con papel japonés.

Una vez seleccionado el adhesivo más adecuado para laminar, se efectuó el refuerzo en todos los materiales contemplados en la presente tesis, es decir, papeles modelo envejecidos y sin envejecer, y libros antiguos.

Las muestras a ensayar eran, por tanto, los papeles modelo (antes y después de ser envejecidos), y los libros. Estas muestras fueron caracterizadas también tras la laminación con celulosa bacteriana y con papel japonés, y, asimismo, tras el proceso de envejecimiento posterior a dicha laminación:

M: Pasta mecánica

M_E: Pasta mecánica envejecida

Q: Pasta química

Q_E: Pasta química envejecida

F: Filtro

F_E: Filtro envejecido

M-CB: Pasta mecánica laminada con celulosa bacteriana

(M-CB)_E: Pasta mecánica laminada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida.

M_E-CB: Pasta mecánica envejecida laminada con celulosa bacteriana

(M_E-CB)_E: Pasta mecánica envejecida laminada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida

M-PJ: Pasta mecánica laminada con papel japonés

(M-PJ)_E: Pasta mecánica laminada con papel japonés y posteriormente envejecida.

M_E-PJ: Pasta mecánica envejecida laminada con papel japonés

(M_E-PJ)_E: Pasta mecánica envejecida laminada con papel japonés y posteriormente envejecida.

Q-CB: Pasta química laminada con celulosa bacteriana

(Q-CB)_E: Pasta química laminada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida.

Q_E-CB: Pasta química envejecida laminada con celulosa bacteriana

(Q_E-CB)_E: Pasta química envejecida laminada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida

Q-PJ: Pasta química laminada con papel japonés

(Q-PJ)_E: Pasta química laminada con papel japonés y posteriormente envejecida.

Q_E-PJ: Pasta química envejecida laminada con papel japonés

(Q_E-PJ)_E: Pasta química envejecida laminada con papel japonés y posteriormente envejecida.

F-CB: Filtro laminado con celulosa bacteriana

(F-CB)_E: Filtro laminado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

F_E-CB: Filtro envejecido laminado con celulosa bacteriana

(F_E-CB)_E: Filtro envejecido laminado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido.

F-PJ: Filtro laminado con papel japonés

(F-PJ)_E: Filtro laminado con papel japonés y posteriormente envejecido

F_E-PJ: Filtro envejecido laminado con papel japonés

(F_E-PJ)_E: Filtro envejecido laminado con papel japonés y posteriormente envejecido

L₁: Libro 1

L₂: Libro 2

L₃: Libro 3

L₁-CB: Libro 1 laminado con celulosa bacteriana

(L₁-CB)_E: Libro 1 laminado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

L₁-PJ: Libro 1 laminado con papel japonés

(L₁-PJ)_E: Libro 1 laminado con papel japonés y posteriormente envejecido

L₂-CB: Libro 2 laminado con celulosa bacteriana

(L₂-CB)_E: Libro 2 laminado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

L₂-PJ: Libro 2 laminado con papel japonés

(L₂-PJ)_E: Libro 2 laminado con papel japonés y posteriormente envejecido

L₃-CB: Libro 3 laminado con celulosa bacteriana

(L₃-CB)_E: Libro 3 laminado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

L₃-PJ: Libro 3 laminado con papel japonés

(L₃-PJ)_E: Libro 3 laminado con papel japonés y posteriormente envejecido

5.2.- Generación de celulosa bacteriana *in situ*

Antes de aplicar la celulosa bacteriana sobre los papeles, éstos fueron esterilizados en autoclave. Todo el proceso de restauración se llevó a cabo en condiciones estériles. La producción de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar se efectúa con la concentración de inóculo y el procedimiento seleccionado en el apartado 2.2.3.2, siendo las muestras a ensayar las siguientes:

M-CB: Pasta mecánica reforzada con celulosa bacteriana

(M-CB)_E: Pasta mecánica reforzada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida.

M_E-CB: Pasta mecánica envejecida reforzada con celulosa bacteriana

(M_E-CB)_E: Pasta mecánica envejecida reforzada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida

Q-CB: Pasta química reforzada con celulosa bacteriana

(Q-CB)_E: Pasta química reforzada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida.

Q_E-CB: Pasta química envejecida laminada con celulosa bacteriana

(Q_E-CB)_E: Pasta química envejecida reforzada con celulosa bacteriana y posteriormente envejecida

F-CB: Filtro reforzado con celulosa bacteriana

(F-CB)_E: Filtro reforzado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

F_E-CB: Filtro envejecido reforzado con celulosa bacteriana

(F_E-CB)_E: Filtro envejecido reforzado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido.

L₁-CB: Libro 1 reforzado con celulosa bacteriana

(L₁-CB)_E: Libro 1 reforzado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

L₂-CB: Libro 2 reforzado con celulosa bacteriana

(L₂-CB)_E: Libro 2 reforzado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

L₃-CB: Libro 3 reforzado con celulosa bacteriana

(L₃-CB)_E: Libro 3 reforzado con celulosa bacteriana y posteriormente envejecido

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Como ya se explicó en la Introducción (apartado 3.3.5), las condiciones de cultivo determinan, en gran medida, la calidad de la celulosa que se va a producir. Entre ellas son especialmente importantes el método de cultivo (estático o agitado), el pH, y la temperatura (Chawla *et al.*, 2009), así como las fuentes de carbono y nitrógeno. El método de cultivo influye en la morfología macroscópica de la celulosa bacteriana (Yamanaka *et al.*, 2000). Así, un cultivo estático dará lugar a una capa gelatinosa de fibras de celulosa (Czaja *et al.*, 2004), mientras que si el cultivo es agitado dará lugar a una estructura en gránulos (Vandamme *et al.*, 1998). En cuanto al pH, estudios efectuados han mostrado valores óptimos en el rango de 4,5 y 7,5, con un máximo alrededor de 6,5 (Çoban and Biyik, 2011; Son *et al.*, 2001). Por otro lado, diversos autores han concluido que la temperatura óptima para producir celulosa bacteriana es de 30 °C (Pourramezan *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2001).

A la vista de estos datos se fijan, para los experimentos de esta tesis, un método de cultivo estático, un pH que no supera 6,5 y una temperatura de crecimiento de 30° C. Se evalúa, en este capítulo, el efecto que las fuentes de nitrógeno y carbono del medio de cultivo puedan tener en las características de la celulosa generada por *G. sucrofermentans* CECT 7291. Partiendo del medio de cultivo HS, se seleccionó la fuente de carbono óptima para el posible uso de la celulosa bacteriana en restauración. Utilizando esta fuente de carbono óptima en el medio HS, se seleccionaron las fuentes de nitrógeno más adecuadas. Finalmente, se observó el efecto que la adición de un 1% de etanol tiene sobre las capas de celulosa obtenidas con el medio de cultivo seleccionado. Se evaluó no sólo la productividad, sino parámetros tales como la resistencia mecánica, la opacidad o el amarilleamiento, que son decisivos para implementar el uso de la celulosa bacteriana como material de restauración. Para evaluar las características de las capas de celulosa bacteriana en los tres casos descritos, se analizaron cinco láminas para cada uno de los diferentes medios de cultivo a los 4, 7, 10 y 13 días de cultivo. Todos los ensayos se realizaron tras una etapa de purificación alcalina, tal y como se describió en el capítulo 2.2.4.1 de Materiales y Métodos.

1.1.- Selección de la fuente de carbono

Para seleccionar la fuente de carbono que proporcione la celulosa más adecuada para los objetivos de esta tesis, se modificó el medio HS sustituyendo la glucosa por fructosa, sacarosa, manitol y glicerol sucesivamente, a una concentración de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

El patrón de consumo de fuente de carbono, que se muestra en la figura 27, cambia con la fuente seleccionada. Así la fructosa y el glicerol son consumidos de manera más lenta. Por el contrario glucosa, sacarosa y manitol dan lugar a una respuesta rápida, de tal manera que, en estos casos, tras 7 días de cultivo, en el medio de cultivo queda menos del 20% de la fuente de carbono inicial.

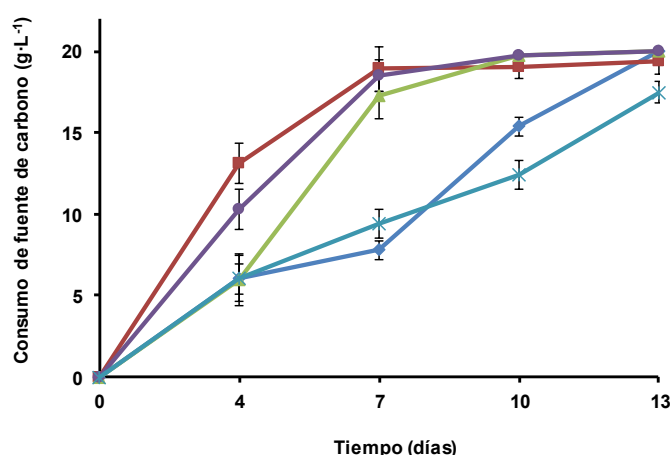


Figura 27. Consumo de fuente de carbono. (◆) Glicerol, (■) Glucosa, (▲) Sacarosa, (●) Manitol, y (×) Fructosa.

Este patrón de consumo no tiene una relación directa con la producción de celulosa (figura 28), ya que la eficacia en la utilización de la fuente de carbono varía. Así, con glucosa y sacarosa se produce una pequeña cantidad de celulosa con un máximo a tiempos cortos, mientras que con glicerol, manitol y fructosa, la celulosa se produce de manera continua hasta el final del ensayo, alcanzando valores finales superiores a los de glucosa y sacarosa. Mikkelsen *et al.* (2009) ya describieron distintas tasas de producción

según la fuente de carbono. Estos autores también observaron que la producción de celulosa bacteriana comenzaba más tarde con sacarosa que con otras fuentes de carbono. Este retraso en comenzar a producir CB puede ser debido a que esta fuente de carbono ha de ser hidrolizada a glucosa y fructosa en el periplasma, dada la imposibilidad de transportar sacarosa a través de la membrana celular (Velasco-Bedrán y López-Isunza, 2007). Keshk y Sameshima (2005) estudiaron glucosa, glicerol y fructosa como fuentes de carbono y obtuvieron resultados similares en cuanto al consumo de fuente de carbono, aunque encontraron un comportamiento diferente en la producción de CB.

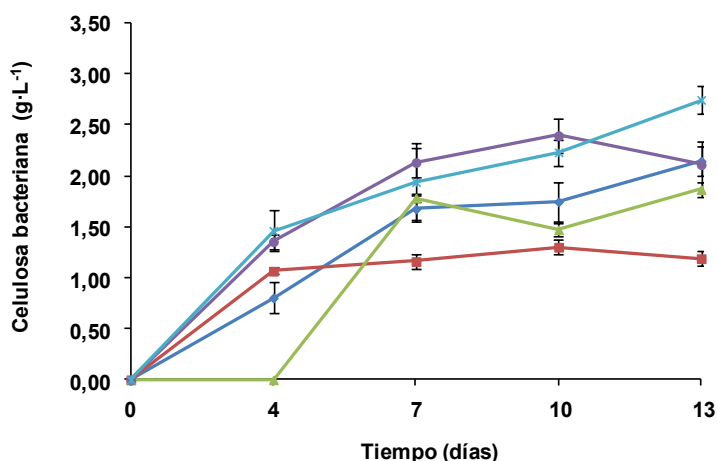


Figura 28. Producción de celulosa bacteriana con distintas fuentes de carbono. (♦) Glicerol, (■) Glucosa, (▲) Sacarosa, (●) Manitol, y (×) Fructosa.

Las diferencias observadas entre las fuentes de carbono pueden ser consecuencia de la existencia de dos grandes vías anfibólicas operativas (Ross *et al.*, 1991), el ciclo de las pentosas fosfato para la oxidación de carbohidratos, y el ciclo de Krebs para la oxidación de ácidos orgánicos. En cualquier caso, Mikkelsen *et al.* (2009) concluyeron que el producto formado era indistinguible, desde el punto de vista de características moleculares y microscópicas, fuera cual fuera la fuente de carbono utilizada. Los resultados obtenidos indican que, para la cepa *G. sucrofermentans* CECT 7291, la producción de celulosa mejora cuando la fuente de carbono es fructosa, ya que la

bacteria produce una cantidad considerable de celulosa ($2,7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sin haber llegado a agotar la fuente de carbono disponible.

Otro parámetro de interés en la selección de la fuente de carbono es el pH. Si la celulosa va a ser generada directamente sobre un material que puede degradarse a ciertos pHs, como es el caso de restauración de documentos históricos, el pH debe ser el adecuado para evitar que se produzca la hidrólisis de la celulosa del papel. Como se muestra en la figura 29, los medios con fructosa, manitol y glicerol hacen que el pH del medio de cultivo disminuya en menos de una unidad (valor final 5,5-6,0), siendo compatible con la restauración del papel. Sin embargo, en el caso de los medios con glucosa y sacarosa, el pH se reduce a valores inferiores a 4,5. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Keshk y Sameshima (2005), que encontraron un importante descenso en el pH para la glucosa como fuente de carbono, pero un pH estable para fructosa y glicerol a lo largo de todos sus experimentos. La rápida caída de pH en el caso de la glucosa se explica porque ésta se convierte en ácido glucónico (Hwang *et al.*, 1999). La sacarosa induce también un descenso de pH, pero menos acusado, ya que en un primer momento se disocia en glucosa y fructosa, con lo que la glucosa disponible para ser convertida a ácido glucónico es la mitad.

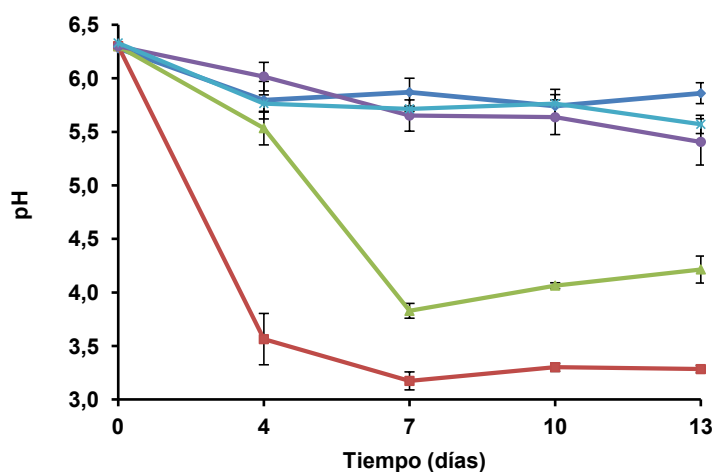


Figura 29. pH del medio de cultivo. (♦) Glicerol, (■) Glucosa, (▲) Sacarosa, (●) Manitol, y (×) Fructosa.

Tras lavar las capas de celulosa bacteriana con hidróxido de sodio al 1% y agua destilada, su pH, que originalmente era el mismo que el del medio de cultivo, resulta ser, independientemente de la fuente de carbono, entre 12,0 y 12,5. Por lo tanto estas diferencias de pH son importantes si la celulosa se genera sobre el papel a restaurar, pero no si la celulosa se genera *a priori* y se aplica a dicho papel posteriormente. En el primer caso no convendría usar ni glucosa ni sacarosa como fuentes de carbono.

Las propiedades mecánicas y ópticas de la celulosa generada varían con la fuente de carbono (tabla 5). Así, el índice de estallido oscila entre 5 y 15 KPa m²·g⁻¹ sin ningún patrón aparente, aunque en todos los casos los valores de este parámetro son superiores a los encontrados habitualmente en la industria papelera. En el papel, a mayor número de enlaces fibra-fibra y de mejor calidad, lo que se puede conseguir con un refino más intenso, mayor resistencia a la tracción y al estallido (Smook, 1990). Como ya se ha dicho el tamaño de los elementos estructurales de la celulosa bacteriana es muy pequeño, con lo que el número de enlaces entre ellos resulta ser muy elevado y, por tanto, el índice de estallido alcanza valores muy altos. En cuanto a la resistencia al desgarro, los datos obtenidos son bajos en todos los casos, independientemente de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo, lo que es consistente con lo encontrado por Surma-Slusarska *et al.* (2008).

Las propiedades ópticas de la celulosa bacteriana generada (tabla 5), también tienen una distribución de valores dispersa, especialmente el amarilleamiento, que oscila entre 10 y 40% pero sin una clara tendencia. Hay que tener en cuenta que estas propiedades pueden ser modificadas posteriormente mediante distintos tratamientos (blanqueo, adición de minerales, colorantes, agentes blanqueantes fluorescentes, etc.) para adecuarlas al uso final de la celulosa bacteriana.

Fuente de carbono	Tiempo (días)	Índice de estallido (KPa·m ² ·g ⁻¹)	Índice de desgarro (mN·m ² ·g ⁻¹)	Opacidad (%)	Amarilleamiento (%)
Glucosa	4	7,6	2,1	20,85	12,80
	7	11,7	3,3	17,75	10,41
	10	10,2	1,5	21,75	25,15
	13	9,6	2,8	15,24	20,35
Fructosa	4	10,4	0,9	20,13	20,17
	7	11,4	1,5	16,93	36,03
	10	6,6	0,6	71,41	39,27
	13	7,0	0,8	20,56	33,48
Sacarosa	4	a	a	a	a
	7	6,7	1,1	12,67	14,89
	10	5,2	1,2	13,24	30,76
	13	11,0	1,8	17,56	29,96
Glicerol	4	b	2,2	15,13	2,41
	7	11,7	1,7	17,14	35,03
	10	14,9	1,7	24,43	30,51
	13	13,6	1,0	23,00	30,97
Manitol	4	10,3	2,7	16,32	19,11
	7	13,5	1,6	15,83	38,41
	10	12,9	1,4	16,26	40,71
	13	12,0	0,9	18,62	14,26

a, no se ha formado la lámina de CB; b, por debajo del límite de sensibilidad del equipo

Tabla 5. Variación de las propiedades ópticas y mecánicas de las capas de CB generadas con distintas fuentes de carbono (las desviaciones estándar fueron menores del 10%).

Mediante la observación de la tasa de producción de la CB y sus propiedades, podemos seleccionar la fuente de carbono adecuada para realizar la segunda parte de este trabajo, en la que se estudia la fuente de nitrógeno. Parece claro que los valores de las propiedades mecánicas son suficientes sea cual sea la fuente de carbono, mientras que las propiedades ópticas siempre son aceptables. Así, el principal criterio de selección ha sido la tasa de producción de celulosa y un pH moderado, que no descienda

notablemente poniendo en peligro la integridad de la celulosa. Como se ha visto, la mejor tasa de producción de celulosa se obtiene con fructosa, que proporciona también un pH adecuado, por lo se emplea fructosa como fuente de carbono en los siguientes experimentos.

1.2.- Selección de las fuentes de nitrógeno

Se realizaron experimentos previos en medio sólido, que demostraron que *G. sucrofermentans* CECT 7291 no crece en ausencia de nitrógeno orgánico. Esto concuerda con lo obtenido por Rani y Appaiah (2011) para *G. hansenii* UAC09, y Son *et al.* (2001) para *Acetobacter sp.* A9. Por lo tanto se incluyó, en todas las combinaciones que se ensayaron, una fuente de nitrógeno orgánico: extracto de levadura-peptona (EL+P), extracto de levadura-asparagina (EL+Asn), extracto de levadura-nitrato de potasio (EL+KNO₃), extracto de levadura-sulfato de amonio (EL+(NH₄)₂SO₄), extracto de levadura-extracto de maíz (EL+CSL), peptona-asparagina (P+Asn), peptona-nitrato de potasio (P+KNO₃), peptona-sulfato de amonio (P+(NH₄)₂SO₄), y peptona-extracto de maíz (EL+CSL).

Cuando el ensayo concluyó, tras 13 días de cultivo, no se obtuvo capa de celulosa con las siguientes combinaciones de fuentes de nitrógeno: P+Asn, P+KNO₃, P+(NH₄)₂SO₄ y EL+(NH₄)₂SO₄. Se decidió continuar el ensayo una semana más para estos cuatro casos. Las tres primeras combinaciones no dieron lugar a capa celulosa en ningún momento, pero sí lo hizo la combinación EL+(NH₄)₂SO₄, aunque en cantidades muy bajas, por lo que no se tuvo en consideración.

Los datos de consumo de fructosa y producción de celulosa bacteriana de las combinaciones que sí generaron capa, se muestran en las figuras 30 y 31.

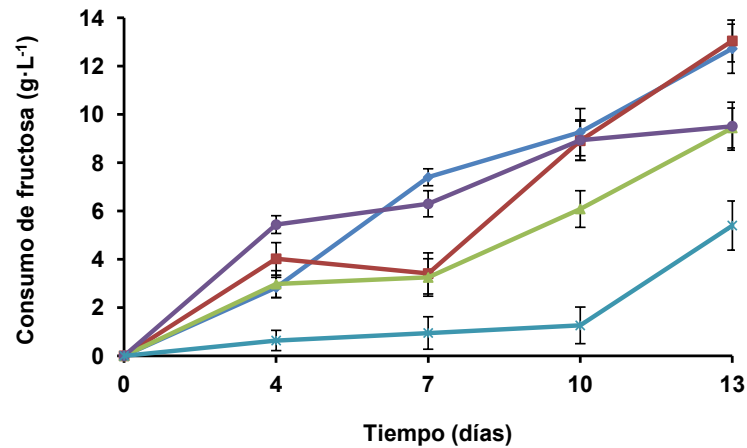


Figura 30. Consumo de fructosa con distintas fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo.

(♦) EL+P, (■) EL+CSL, (▲) EL+Asn, (●) P+CSL, y (×) EL+KNO₃.

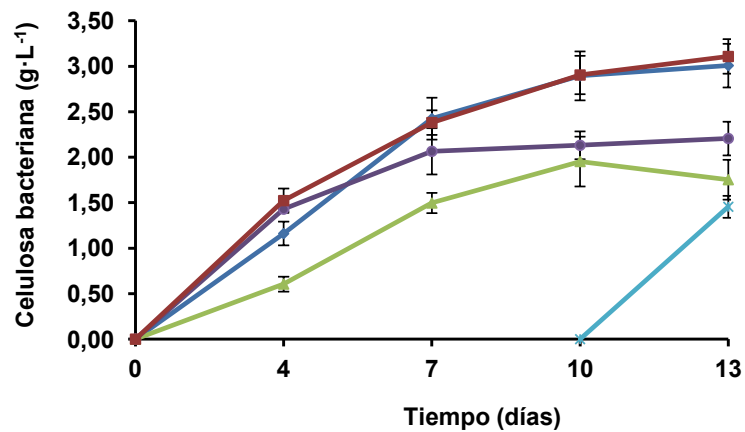


Figura 31. Producción de celulosa bacteriana con distintas fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo.

(♦) EL+P, (■) EL+CSL, (▲) EL+Asn, (●) P+CSL, y (×) EL+KNO₃.

De las combinaciones que sí dan lugar a celulosa, el único caso en el que se ha utilizado una fuente de nitrógeno inorgánico, EL+KNO₃, presenta bajo un consumo de fructosa con poca producción de CB a partir del día 10, lo que indica un bajo crecimiento bacteriano. El uso de asparagina proporciona celulosa desde el primer momento, pero la

producción máxima nunca sobrepasa $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La peptona o el extracto de maíz, en combinación con el extracto de levadura, dan lugar a la mayor producción de CB, con valores cercanos a $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ al final de los experimentos. Sin embargo, la combinación P+CSL produce menor cantidad de celulosa. Así que parece obvia la necesidad de utilizar extracto de levadura en combinación con peptona o extracto de maíz para obtener elevados valores de producción de CB. Cuando se utiliza cualquiera de estas combinaciones de fuentes de nitrógeno, el consumo de fructosa por parte de la población bacteriana es similar. Estos datos son consistentes con Coban y Biyik (2011). Tsuchida y Yoshinaga (1997) observaron que la presencia de lactato en el extracto de maíz estimulaba el crecimiento celular y la producción de CB por *G. sucrofermentans*.

La producción de CB no presenta grandes cambios de pH, que oscila desde 5,2 hasta 6,4, y sólo cuando en el medio de cultivo hay EL+Asn aparece una tendencia ascendente más allá de este intervalo (figura 32). Esto puede deberse a la presencia de amonio en el medio procedente de la degradación de la asparagina. Al igual que en el caso del carbono, tras la purificación alcalina y el lavado posterior, las capas de CB alcanzan un pH entre 12,0 y 12,5.

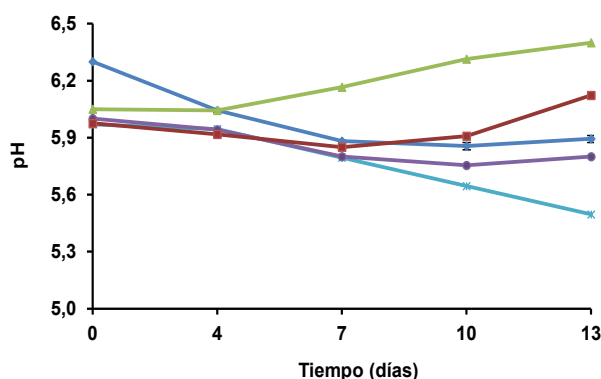


Figura 32. pH del medio de cultivo para distintas fuentes de nitrógeno. (♦) EL+P, (■) EL+CSL, (▲) EL+Asn, (●) P+CSL, y (×) EL+KNO₃ (las desviaciones estándar fueron menores del 1%).

En cuanto a sus propiedades mecánicas (tabla 6), el índice de estallido es significativamente menor con EL+Asn o EL+KNO₃. Para las otras combinaciones permanece constante a lo largo del experimento, con la mayoría de los valores oscilando entre 4 y 10 kPa·m²·g⁻¹, elevados comparados con los habitualmente encontrados en papel. La resistencia al desgarro, al igual que en el estudio sobre la fuente de carbono, presenta valores bajos y dispersos, oscilando entre 2 y 9 mN·m²·g⁻¹, por lo que no es un elemento discriminatorio. Las propiedades ópticas en general se mantienen en el mismo intervalo que el ya mostrado para el caso del estudio de la fuente de carbono (tabla 5).

Fuente de nitrógeno	Tiempo (días)	Índice de estallido (KPa·m ² ·g ⁻¹)	Índice de desgarro (mN·m ² ·g ⁻¹)	Opacidad (%)	Amarilleamiento (%)
Extracto de levadura + Peptona	4	4,1	5,4	16,55	12,68
	7	10,5	3,1	18,48	38,57
	10	8,9	2,6	22,16	36,91
	13	8,0	2,1	22,91	46,00
Extracto de levadura + Asparagina	4	b	9,3	14,76	3,08
	7	4,3	4,4	15,00	20,25
	10	3,2	3,4	14,95	30,27
	13	2,7	2,9	15,00	21,36
Peptona + Extracto de maíz	4	6,6	4,6	19,30	23,63
	7	10,1	3,7	20,32	30,91
	10	10,3	3,3	20,11	34,72
	13	9,0	3,3	18,78	34,53
Extracto de levadura + Extracto de maíz	4	6,8	4,6	24,48	16,48
	7	11,9	3,5	22,28	33,44
	10	10,8	2,9	25,25	37,05
	13	13,6	2,2	23,47	37,41
Extracto de levadura + Nitrato de potasio	4	a	a	a	a
	7	a	a	a	a
	10	a	a	a	a
	13	6,3	2,5	16,04	26,73

a, no se ha formado la lámina de CB; b, por debajo del límite de sensibilidad del equipo

Tabla 6. Variación de las propiedades ópticas y mecánicas de las capas de CB a diferentes tiempos según la fuente de nitrógeno utilizada (desviaciones estándar menores del 10%).

A la vista de todos los resultados anteriores se concluye que las combinaciones más adecuadas de fuente de nitrógeno son EL+P y EL+CSL. Entre ambas no hay diferencias significativas, por lo que el efecto del etanol se evalúa a continuación sobre las dos combinaciones, manteniendo la fructosa como fuente de carbono.

1.3.- Evaluación del efecto del etanol

Como ya se comentó en la Introducción, se ha puesto de manifiesto que la adición de un 1% de etanol puede aumentar la producción de celulosa bacteriana (Yunoki *et al.*, 2004). Se realizaron ensayos para ver si con nuestra cepa y condiciones de cultivo este efecto era significativo. Se midió la producción de celulosa bacteriana con las fuentes de carbono y nitrógeno preseleccionadas, en presencia y ausencia de un 1% de etanol. En cuanto al consumo de fructosa (figura 33), los medios que contienen etanol muestran valores ligeramente menores. Este efecto ya fue observado por Park *et al.* (2003) y por Yunoki *et al.* (2004). Sin embargo, ambos autores encontraron un incremento en la producción de celulosa en presencia de etanol desde el comienzo del ensayo, mientras que en nuestros experimentos sólo encontramos este incremento al final de los mismos, y sólo en el caso de que la fuente de nitrógeno sea la combinación EL+CSL (figura 34).

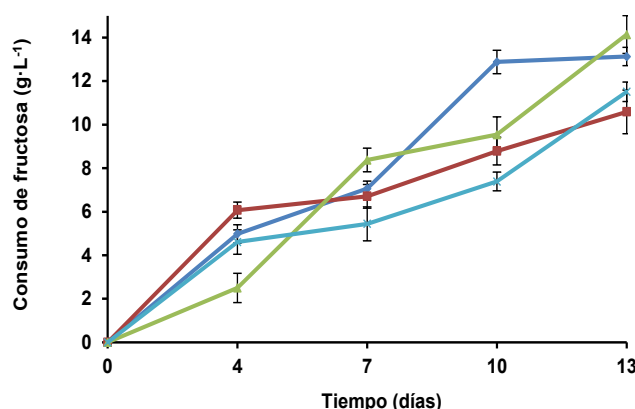


Figura 33. Consumo de fructosa. (♦) EL+P, (■) EL+P(EtOH), (▲) EL+CSL, y (×) EL+CSL(EtOH).

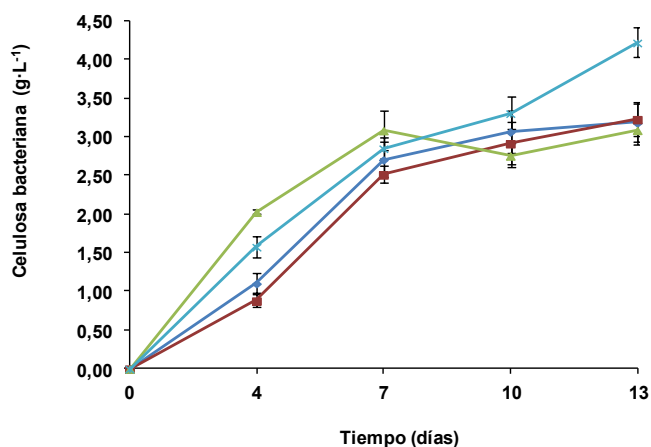


Figura 34. Producción de celulosa bacteriana. (♦) EL+P, (■) EL+P(EtOH), (▲) EL+CSL, y (×) EL+CSL(EtOH).

En ambos casos la adición de etanol implica un descenso del pH (figura 35) de más de dos puntos el día 4, por lo que el aumento en la producción de CB logrado con el etanol en el caso de EL+CSL sólo es útil si su formación no se realiza sobre el documento a restaurar. Yunoki *et al.* (2004), con *A. xylinum* ATCC 10245, no observaron diferencias en el pH por presencia de etanol durante 7 días. Sin embargo Park *et al.* (2003) con *G. hansenii* encontraron un descenso del pH próximo a 3 unidades en el día 5.

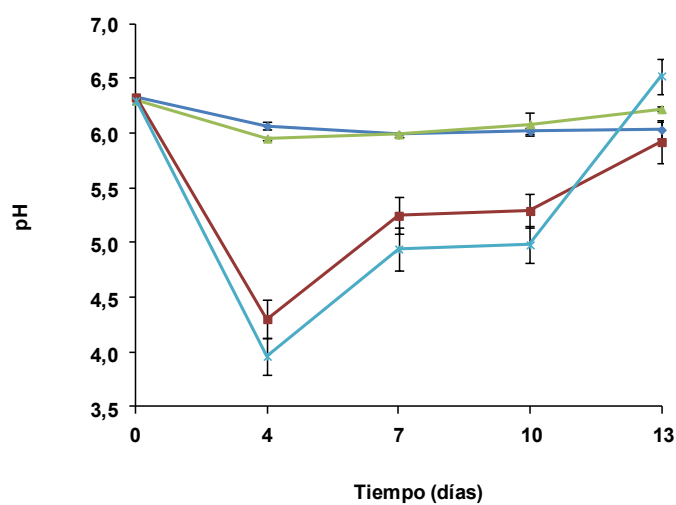


Figura 35. pH del medio de cultivo. (♦) EL+P, (■) EL+P(EtOH), (▲) EL+CSL, y (×) EL+CSL(EtOH).

En este caso, el pH medido en las capas de celulosa bacteriana generada a los distintos tiempos, y tras ser purificada con un tratamiento alcalino y un posterior lavado con agua destilada, depende del día en el que se efectúen las medidas. Como se puede observar en la figura 36, si bien las capas generadas con medios de cultivo en ausencia de etanol mantienen siempre un pH próximo a 12,0, cuando en el medio de cultivo hay etanol el pH se mantiene bajo en los primeros días de cultivo, y va aumentando hasta alcanzar un pH cercano a 11,0.

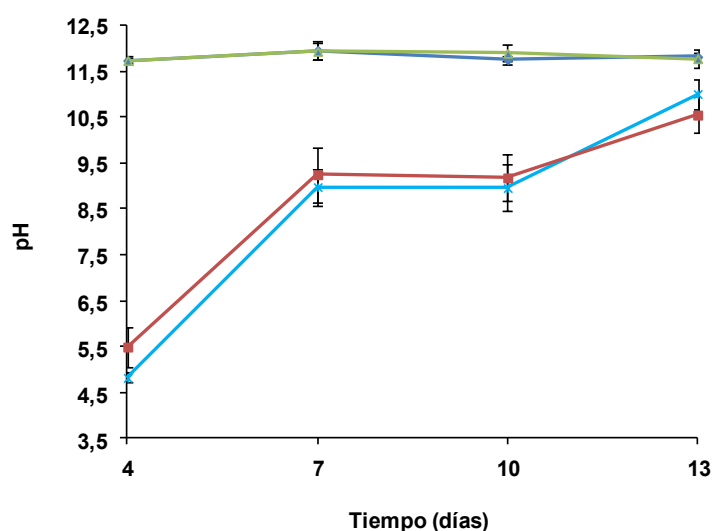


Figura 36. pH de las capas de celulosa bacteriana tras una purificación alcalina y posterior lavado con agua destilada. (♦) EL+P, (■) EL+P(EtOH), (▲) EL+CSL, y (×) EL+CSL(EtOH).

Sobre el efecto del etanol en las propiedades mecánicas y ópticas (tabla 7), los índices de estallido son similares y elevados en todos los casos, aunque la combinación EL+CSL en ausencia de etanol proporciona una capa de celulosa ligeramente más resistente (tabla 6).

Fuente de nitrógeno	Tiempo (días)	Índice de estallido (KPa·m ² ·g ⁻¹)	Índice de desgarro (mN·m ² ·g ⁻¹)	Opacidad (%)	Amarilleamiento (%)
Extracto de levadura + Peptona + EtOH	4	4,9	3,0	21,90	22,76
	7	8,3	3,3	24,25	51,81
	10	7,3	2,7	24,10	50,67
	13	9,8	3,2	27,52	43,38
Extracto de levadura + Extracto de maíz + EtOH	4	3,0	3,8	28,71	35,27
	7	10,3	3,2	27,86	53,27
	10	11,1	3,3	29,65	45,18
	13	9,6	3,4	37,49	43,52

Tabla 7. Variación de las propiedades ópticas y mecánicas de las capas de celulosa bacteriana generadas a diferentes tiempos con etanol según la fuente de nitrógeno utilizada (desviaciones estándar menores del 10%).

1.4.- Conclusiones

Como se puede observar, parece razonable el empleo de celulosa bacteriana en la restauración de documentos degradados, ya que posee alta resistencia al estallido, aceptable resistencia al desgarro y buenas propiedades ópticas, como la baja opacidad que permite observar el documento que cubre.

La mejor combinación resultó ser fructosa con extracto de levadura y extracto de maíz, proporcionando un buen balance entre la tasa de producción de celulosa y el consumo de fuente de carbono, y generando una capa homogénea y resistente. Se ha comprobado que la adición de 1% de etanol mejora la producción de celulosa bacteriana, pero se traduce en un pH significativamente menor. Esta disminución de pH es una gran desventaja cuando la celulosa se va a generar directamente en el papel a restaurar, ya que podría incluso llegar a producir hidrólisis ácida. Sin embargo, esta limitación no existe si las capas de celulosa bacteriana se generan *ex situ* y se aplican sobre el papel tras una etapa de purificación que neutraliza el pH.

En resumen, si la celulosa bacteriana para reforzar el papel se va a formar directamente sobre éste, el medio seleccionado será EL+CSL en ausencia de etanol, que proporciona una celulosa algo más resistente, mientras que el desgarro y las propiedades ópticas no presentan diferencias significativas. Por otro lado, si la celulosa bacteriana se forma de manera independiente y luego se aplica al papel, el medio de cultivo será el formado por EL+CSL con un aporte de un 1% de etanol. En ambos casos la fructosa será la fuente de carbono utilizada.

2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CAPAS DE CELULOSA BACTERIANA

Una vez optimizado el medio de cultivo para la generación de las capas de celulosa bacteriana, se determinaron la morfología y la estructura de dichas capas. El medio de cultivo optimizado resultó ser aquel que contenía fructosa como fuente de carbono, y extracto de levadura y extracto de maíz como fuentes de nitrógeno. En cuanto al uso de un 1% de etanol, se concluyó que era positivo si las capas se iban a producir de manera independiente para aplicarse posteriormente al papel a restaurar, pero negativo si la celulosa bacteriana iba a generarse directamente sobre dichos documentos.

Independientemente de la presencia o ausencia de etanol, ha de efectuarse una etapa de purificación para eliminar las bacterias y el medio de cultivo de la celulosa bacteriana antes de su aplicación a papel. En todos los casos, después de los tratamientos de purificación especificados en el apartado 2.2.4 de Materiales y Métodos (alcalinos, anaerobiosis, antibiótico, térmico), se sembraron muestras de la celulosa bacteriana purificada en placas Petri de 90 mm con medio HS sólido, resultando que crecieron bacterias en todos los casos salvo con los tratamientos alcalinos. Se repitieron todos los ensayos de purificación, salvo éstos últimos, con una duración de los tratamientos de 24 horas. Los resultados fueron:

1. Tras 24 h en anaerobiosis:

- CB generada en medio de cultivo sin etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada no crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada no crecía la bacteria
- CB generada en medio de cultivo con etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada sí crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada sí crecía la bacteria

2. Tras 24 h en ampicilina en una concentración de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$:

- CB generada en medio de cultivo sin etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada no crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada no crecía la bacteria
- CB generada en medio de cultivo con etanol:

- si se había lavado con NaCl y agua destilada no crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada sí crecía la bacteria
3. Tras 24 h a una temperatura de 65 °C:
- CB generada en medio de cultivo sin etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada no crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada no crecía la bacteria
 - CB generada en medio de cultivo con etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada no crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada no crecía la bacteria
4. Control:
- CB generada en medio de cultivo sin etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada sí crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada sí crecía la bacteria
 - CB generada en medio de cultivo con etanol:
 - si se había lavado con NaCl y agua destilada sí crecía la bacteria
 - si sólo se había lavado agua destilada sí crecía la bacteria

A la vista de los resultados obtenidos se seleccionaron dos opciones:

- En caso de que en el medio de cultivo haya etanol, es decir, si la lámina de celulosa bacteriana se va a generar *a priori*, y posteriormente se va a aplicar al papel a restaurar con la ayuda de un adhesivo, la purificación se llevará a cabo mediante un tratamiento alcalino consistente en la inmersión de las capas de celulosa bacteriana en hidróxido de sodio al 1% a 90° C durante una hora. Si bien este ensayo también se efectuó en las mismas condiciones con Na₂CO₃, no se encontró ninguna mejora con respecto al NaOH, por lo que se optó por utilizar este último por ser el tratamiento de purificación más habitual.
- Un tratamiento alcalino podría dañar al documento cuando la capa de celulosa se genera directamente en su superficie. Para evitar daños en el documento se efectúa, en este caso, una purificación a 65 ° C durante 24 horas.

Tanto tras la purificación con el método alcalino como tras el tratamiento térmico, se decide lavar sólo con agua destilada en ambos casos, puesto que el lavado con cloruro de sodio no parece aportar ninguna ventaja. Las capas de CB se generarán, por tanto, con los siguientes métodos, medios de cultivo y métodos de purificación:

- (a) Producción de láminas de celulosa bacteriana y su aplicación posterior al material a restaurar mediante el uso de adhesivos. Medio de cultivo con fructosa, extracto de levadura, extracto de maíz y un 1% de etanol. Método de purificación alcalino (1 hora a 90 °C en NaOH al 1%).
- (b) Generación directa de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar. Medio de cultivo con fructosa, extracto de levadura y extracto de maíz. Método de purificación térmico (24 horas a 65 °C).

Se llevó a cabo un proceso de cultivo de 7 días de duración con los dos medios seleccionados. Tras ese tiempo, la mitad de las capas de celulosa bacteriana generadas con cada medio fueron purificadas, mientras que la otra mitad se mantuvieron sin ningún tratamiento para poder caracterizar el efecto de dicha purificación en las propiedades de la celulosa. La nomenclatura utilizada en este estudio será la siguiente:

E-CB: Capas de celulosa bacteriana generadas en medio de cultivo con 1% de etanol.

E-CB-TA: Capas de celulosa bacteriana generadas en medio de cultivo con 1% de etanol y purificadas con un tratamiento alcalino.

sE-CB: Capas de celulosa bacteriana generadas en medio de cultivo sin etanol.

sE-CB-TT: Capas de celulosa bacteriana generadas en medio de cultivo sin etanol y purificada con un tratamiento térmico.

Además, y para evaluar los cambios que pueda sufrir la celulosa bacteriana con el paso del tiempo, se efectúa en los cuatro casos un proceso de envejecimiento acelerado (figura 37), según lo descrito en el capítulo 3 de Materiales y Métodos.

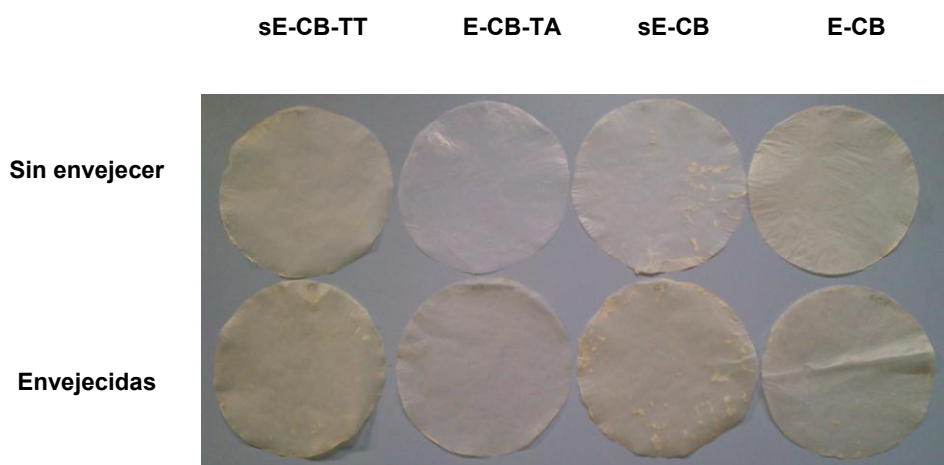


Figura 37. Láminas de celulosa bacteriana.

Antes de su caracterización se acondicionaron las capas, envejecidas y sin envejecer, bajo parámetros estándar (23°C y 50% de humedad relativa) según norma ISO 187:1990. Las láminas de celulosa bacteriana se caracterizaron según lo descrito en el capítulo 4 de Materiales y Métodos, en términos de su resistencia al desgarro y al estallido, blancura, opacidad, amarilleamiento, ángulos de contacto estáticos, porosimetría de intrusión de mercurio, viscosidad, difracción de rayos-X, espectroscopía FTIR, y observación mediante microscopía electrónica de barrido. Las propiedades mecánicas, ópticas y de superficie, así como la porosidad, son parámetros de interés en la fabricación de papel y determinarán el uso y la durabilidad de la celulosa bacteriana en la restauración. Otras propiedades, tales como la cristalinidad y la viscosidad, se refieren a la estructura y la integridad de la celulosa, mientras que la espectroscopía FTIR se ha utilizado para determinar la presencia de sustancias no celulósicas en las muestras.

2.1.- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR permite evaluar la eficacia del método de purificación y determinar la estructura de las capas de celulosa mediante la observación de las bandas de absorción resultantes. Los espectros de las capas de CB generadas con nuestros medios de cultivo, antes y después de los procesos de purificación, se muestran en la

figura 38. En dichos espectros se pueden observar las bandas típicas de la celulosa (enlaces C-O a 1055 cm^{-1} , enlaces C-H a 2900 cm^{-1} , y enlaces O-H a 3340 cm^{-1}). Sugiyama *et al.* (1991), concluyeron que señales próximas a 750 cm^{-1} y 3240 cm^{-1} indican la existencia de celulosa cristalina de tipo I α , y que señales cercanas a 710 cm^{-1} y 3270 cm^{-1} indican celulosa de tipo I β ; por lo tanto los dos polimorfismos están presentes en la celulosa bacteriana generada.

Según Duvey y Saxena (2002), las dos señales que aparecen aproximadamente a 1536 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} (señaladas en color rojo en la figura 38), corresponden a enlaces amida y pueden asociarse con proteínas y biomasa residual, es decir, impurezas biológicas originadas por la bacteria o componentes del medio de cultivo que puedan permanecer adheridos a las capas de celulosa. Se puede apreciar (figuras 38a y 38b) que las capas de celulosa generadas en presencia de 1% etanol proporcionan bandas más grandes que aquellas que se produjeron sin etanol. Esto puede deberse a que el etanol promueve el desarrollo de las bacterias y, como consecuencia, hay mas subproductos, tales como ácidos orgánicos (Li *et al.*, 2012).

La cantidad de impurezas no cambia cuando el tratamiento usado para matar la bacteria fue el tratamiento térmico (figura 38c), comparado con la muestra sin tratar (figura 38a). Sin embargo, con el tratamiento de purificación alcalino las dos señales son más débiles (figura 38d) que las presentes cuando no se da esta purificación (figura 38b). Por tanto se puede deducir que, aunque un tratamiento a 65°C mata la bacteria, no la elimina. Por el contrario, el tratamiento con hidróxido de sodio al 1% sí lo hace, debido a que produce lisis celular (Barud *et al.*, 2008) y rotura química de enlaces.

Cuando las capas de celulosa bacteriana se someten a un proceso de envejecimiento, el espectro FTIR de las capas no muestra diferencias significativas con los resultados obtenidos antes del mismo (figura 38e, 38f, 38g, 38h). Se puede concluir que el proceso de envejecimiento no cambia la estructura de la celulosa bacteriana ni altera la eficacia de los métodos de purificación. Esta estabilidad apoya la posibilidad de usar celulosa bacteriana en la restauración de papel.

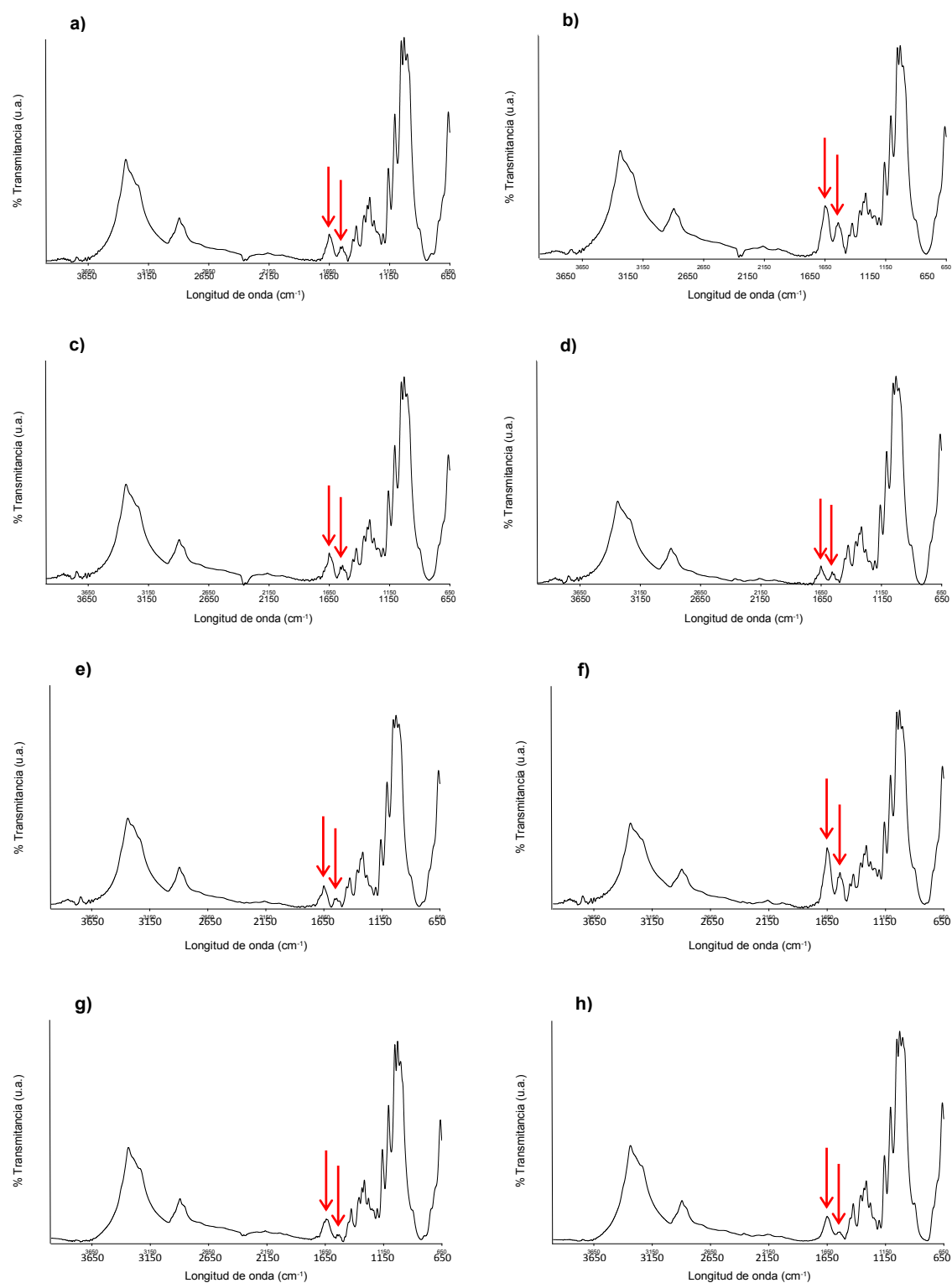
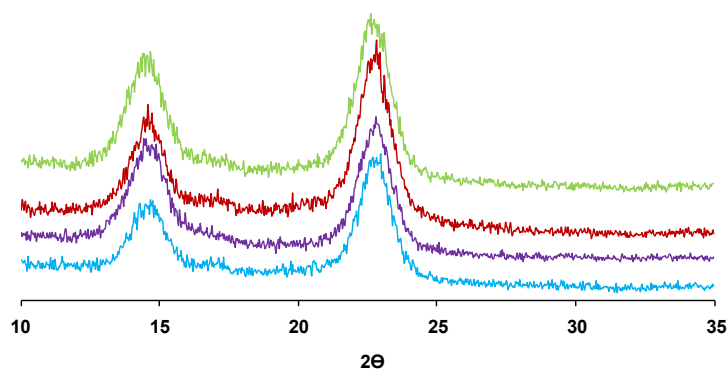


Figura 38. Espectroscopía FTIR de CB sin envejecer y envejecida: **a)** sE-CB, **b)** E-CB, **c)** sE-CB-TT, **d)** E-CB-TA, **e)** (sE-CB) Envejecida, **f)** (E-CB) Envejecida, **g)** (sE-CB-TT) Envejecida, **h)** (E-CB-TA) Envejecida.

2.2.- Difracción de rayos-X

La figura 39 muestra los resultados de los ensayos de difracción de rayos-x (XRD) para las muestras de CB sin envejecer (figura 39a) y envejecidas (figura 39b). Cada una de ellas tiene dos picos de difracción dominantes, el primero localizado entre 13° y 16° y el segundo entre 21° y 25° . Cada pico representa las fases cristalinas $I\alpha$ y $I\beta$. Barud *et al.* (2008), investigaron membranas de CB y sugirieron que el primer pico representa la proyección en los planos (100) de la fracción $I\alpha$ y (110 y 010) de la fracción $I\beta$, y el segundo pico la proyección en los planos (110) de la fracción $I\alpha$ y (200) de la fracción $I\beta$.

(a)



(b)

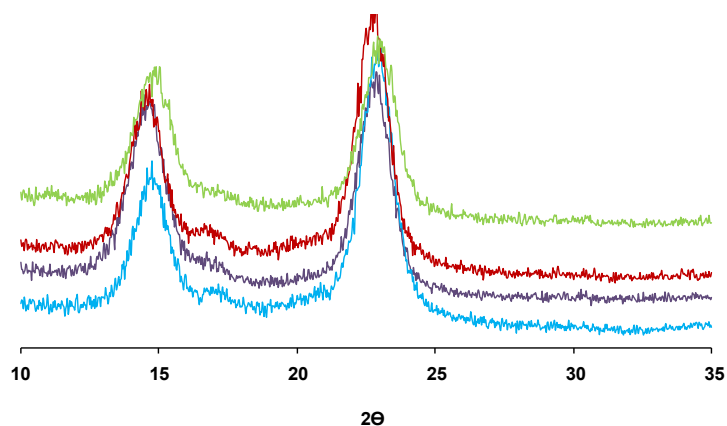


Figura 39. Patrones de difracción de rayos-X de las capas de celulosa bacteriana sin envejecer (a) y envejecidas (b). ■ E-CB ■ sE-CB ■ E-CB-TA ■ sE-CB-TT.

Los índices de cristalinidad (tabla 8), calculados tal y como se describió en el apartado 4.3.3 de Materiales y Métodos, son mayores que los obtenidos con pastas de celulosa vegetal. Valores típicos de estos materiales son 74,9% para pasta de *Eucalyptus grandis*, y 75,5% para pasta de *Pinus taeda* (Poletto *et al.*, 2011).

	Sin envejecer	Envejecidas
sE-CB	83,4	88,6
sE- CB-TT	83,8	89,8
E- CB	86,8	87,2
E-CB-TA	87,7	90,5

Tabla 8. Índice de cristalinidad (%) de las capas de celulosa bacteriana.

Cheng *et al.* (2009), obtuvieron resultados similares en los índices de cristalinidad usando la misma cepa que la utilizada en esta tesis. Se puede observar que las capas más cristalinas se obtuvieron con el tratamiento alcalino, probablemente porque solubiliza la celulosa amorfa y elimina proteínas y ácidos nucleicos de las células bacterianas (George *et al.*, 2005), lo que incrementa la cristalinidad del material. La cristalinidad aumenta con el envejecimiento, posiblemente ésto sea el resultado del lixiviado de metabolitos gracias al efecto combinado de la temperatura y humedad a las que se efectúa dicho proceso (capítulo 3 de Materiales y Métodos).

2.3.- Viscosidad

La viscosidad intrínseca proporciona una estimación del grado de polimerización de la celulosa, e indica la integridad relativa de los elementos estructurales de la misma. La viscosidad de la pasta de celulosa vegetal para producción de papel normalmente

varía entre 550 y 950 mL·g⁻¹ (Lapierre *et al.*, 2009). Como puede observarse en la tabla 9, la viscosidad que se ha encontrado en los ensayos para la celulosa bacteriana obtenida es, en la mayoría de los casos, mayor que esos valores.

	Sin envejecer	Envejecidas
sE-CB	820 ± 4	900 ± 1
sE-CB-TT	1050 ± 1	830 ± 1
E-CB	950 ± 6	1030 ± 1
E-CB-TA	1700 ± 10	1220 ± 1

Tabla 9. Viscosidad (mL·g⁻¹) de las capas de celulosa bacteriana (media ± desviación estándar).

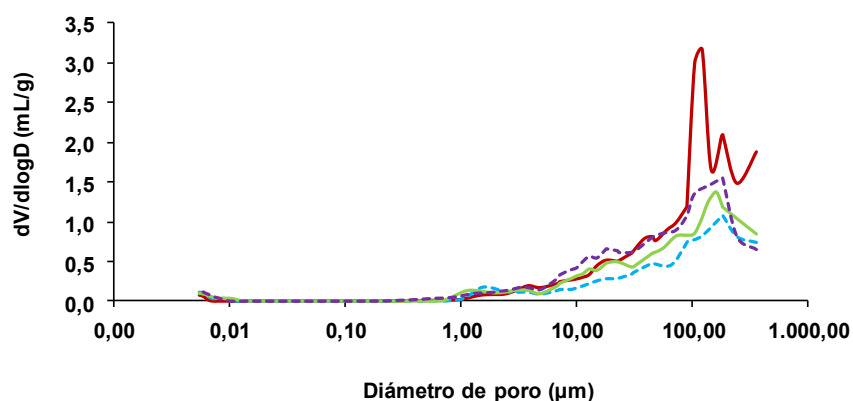
En el caso del método térmico, el aumento de la viscosidad con respecto a las capas sin tratamiento puede ser debido a que dicho método consiga la eliminación de algunos metabolitos gracias a la acción combinada de humedad y temperatura. Sin embargo, el tratamiento alcalino proporciona un mayor incremento en la viscosidad relacionado con la intensa purificación que conlleva (George *et al.*, 2005), y con la eliminación de celulosa de bajo peso molecular (Jahan *et al.*, 2008). El incremento en la viscosidad producido cuando el método de purificación es el alcalino es coherente con la alta cristalinidad encontrada.

El envejecimiento de las capas de celulosa previamente tratadas causa la degradación de las cadenas de celulosa. Sin embargo, el leve aumento de la viscosidad observado en las capas no tratadas tras el proceso de envejecimiento puede deberse al lixiviado de metabolitos, que compensaría el efecto de la degradación de las cadenas de celulosa que se acaba de mencionar.

2.4.- Porosimetría por intrusión de mercurio

Esta técnica es utilizada con frecuencia para caracterizar muestras de papel. Diversos autores han descrito dos tipos de porosidad del papel: porosidad superficial o poros mayores de 10 μm principalmente ubicados en la superficie de la hoja, y porosidad interna o poros con diámetros de menos de 10 μm (Chinga-Carrasco *et al.*, 2008a; Moura *et al.*, 2005). Este mismo criterio se va a utilizar para analizar la CB. La figura 40 muestra las curvas de distribución de tamaño de poros de las muestras.

(a)



(b)

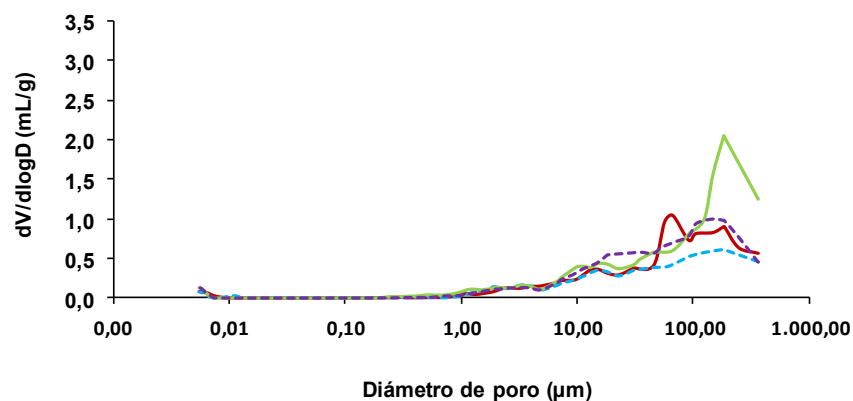


Figura 40. Distribución de tamaño de poro para muestras de celulosa bacteriana no envejecidas (a) y envejecidas (b). ■ E-CB ■ sE-CB ■ E-CB-TA ■ sE-CB-TT

Tal y como se muestra en la figura 40, las mayores diferencias se observan en el rango de diámetros $> 10 \mu\text{m}$. En cuanto a las muestras no envejecidas, las capas generadas en ausencia de etanol presentan la mayor porosidad superficial, mientras que las capas producidas cuando en el medio de cultivo había un 1% de etanol tienen una fracción porosa menor.

La tabla 10 muestra la porosidad total de las capas de celulosa bacteriana. El tratamiento térmico causa una reducción considerable del volumen total de poros cuando se compara con su correspondiente muestra sin purificar, sE-BC, mientras que el tratamiento alcalino proporciona un incremento de la porosidad. Una posible explicación para esto es que la sosa mata y promueve la eliminación de la bacteria, tal y como se deduce de los espectros FTIR, y, como consecuencia, libera los espacios ocupados por el microorganismo incrementando así el volumen de poros. La elevada temperatura del proceso de envejecimiento causa una disminución del volumen de poros, lo que es coherente con la disminución de porosidad causada por el tratamiento térmico. A elevadas temperaturas el agua es parcialmente eliminada de los poros y se forman nuevos enlaces entre cadenas de celulosa adyacentes, fenómeno conocido como hornificación (Fernandes Diniz *et al.*, 2004).

	Sin envejecer	Envejecidas
sE-CB	66,2	52,4
sE-CB-TT	53,3	49,4
E-CB	56,0	56,6
E-CB-TA	61,9	59,3

Tabla 10. Porosidad total (%) de las muestras de celulosa bacteriana.

2.5.- Ángulos de contacto estáticos y dinámicos

Los ángulos de contacto estáticos con agua (α) para las ocho muestras aparecen en la tabla 11. Cuando se comparan las capas sin tratamiento parece evidente que los ángulos son mayores en las capas generadas en presencia de etanol, lo cual puede ser el resultado de que éste contribuya a generar una capa de celulosa con cierta hidrofobicidad superficial.

Si se comparan las capas sin purificar con sus respectivas capas purificadas, podemos ver que las muestras sE-BC-TT tienen un mayor ángulo de contacto que la muestra sE-BC, lo cual puede ser resultado del proceso de purificación, eliminando ciertos metabolitos y causando hidrofobicidad. Sin embargo esta tendencia no es coherente con lo observado en las capas E-CB y E-CB-TA. El fenómeno de “swelling” o hinchamiento de la celulosa, es un efecto bien documentado, que puede ser producido por el hidróxido de sodio entre otros agentes, y es responsable de la disminución del ángulo de contacto (Young, 1994). A la vista de los resultados se puede concluir que el envejecimiento no cambia los datos de modo significativo, especialmente en el caso del tratamiento alcalino, que parece proporcionar unas capas de celulosa muy estables.

	Ángulo de Contacto Estático (°)		Tasa de mojado (°/s)	
	Sin envejecer	Envejecidas	Sin envejecer	Envejecidas
sE-CB	51,5 ± 3,5	65,0 ± 5,2	0,29 ± 0,07	0,18 ± 0,06
sE-CB-TT	84,9 ± 5,1	76,4 ± 5,2	0,29 ± 0,09	0,15 ± 0,05
E-CB	72,3 ± 5,3	76,2 ± 6,7	0,28 ± 0,08	0,16 ± 0,04
E-CB-TA	41,3 ± 3,6	42,7 ± 4,8	0,21 ± 0,05	0,14 ± 0,04

Tabla 11. Ángulos de contacto de las muestras de celulosa bacteriana (media ± desviación estándar).

Los ángulos de contacto dinámico se estimaron a partir de la tasa de mojado ($^{\circ}/s$), que fueron bastante bajas: las gotas eran difícilmente absorbidas o dispersadas en las superficies de las capas de CB tras sesenta segundos de ensayo. Estas tasas eran incluso menores tras el proceso de envejecimiento, lo que puede ser debido al ya comentado fenómeno de hornificación, que provocaba un descenso de la porosidad, ya que el fenómeno de capilaridad juega un importante papel en la mojabilidad a largo plazo. Este es un punto muy importante a tener en cuenta, ya que evitar que se absorba agua es fundamental para la conservación de los documentos restaurados.

2.6.- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología superficial de las capas secas de celulosa bacteriana se muestra en las micrografías SEM (figura 41), donde puede observarse, a 5.000 aumentos en todos los casos, la red ultrafina de nanofibras de celulosa.

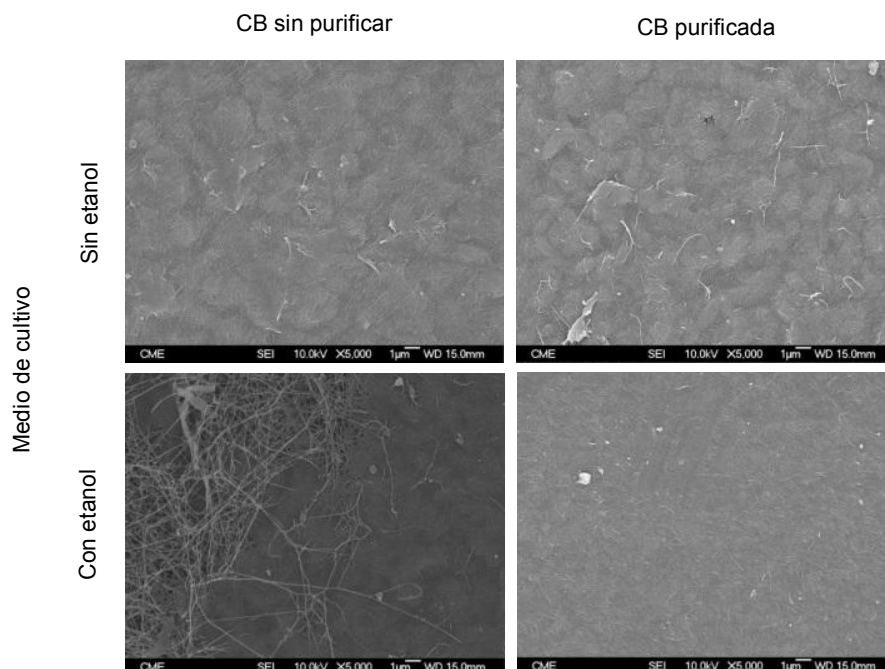


Figura 41. Imágenes SEM de las superficies de las capas de celulosa bacteriana antes y después de ser sometidas a un procedimiento de purificación.

Se muestra en estas microfotografías cómo el tratamiento térmico no elimina las células bacterianas de la capa. Por el contrario, tras el tratamiento alcalino no se observan células bacterianas en la capa de celulosa. En las micrografías SEM de las muestras envejecidas no se observa ningún cambio morfológico significativo en la superficie, por lo que no se incluyen.

La figura 42 muestra las micrografías SEM correspondientes a las secciones transversales de las hojas, antes y después del proceso de envejecimiento.

El descenso en la porosidad, reflejado en un aumento de compactación de las láminas, en el caso de las muestras generadas sin etanol tras su purificación mediante un tratamiento térmico, puede verse claramente.

En todos los casos, el envejecimiento conlleva la compactación de las hojas de celulosa bacteriana, consistente con la disminución de la porosidad y el incremento del índice de cristalinidad vistos anteriormente.

Las altas temperaturas también disminuyen la distancia entre láminas en cada una de las muestras de celulosa bacteriana, lo cual es consistente con los resultados obtenidos con el tratamiento térmico y con los valores de porosidad total ya vistos en la tabla 10.

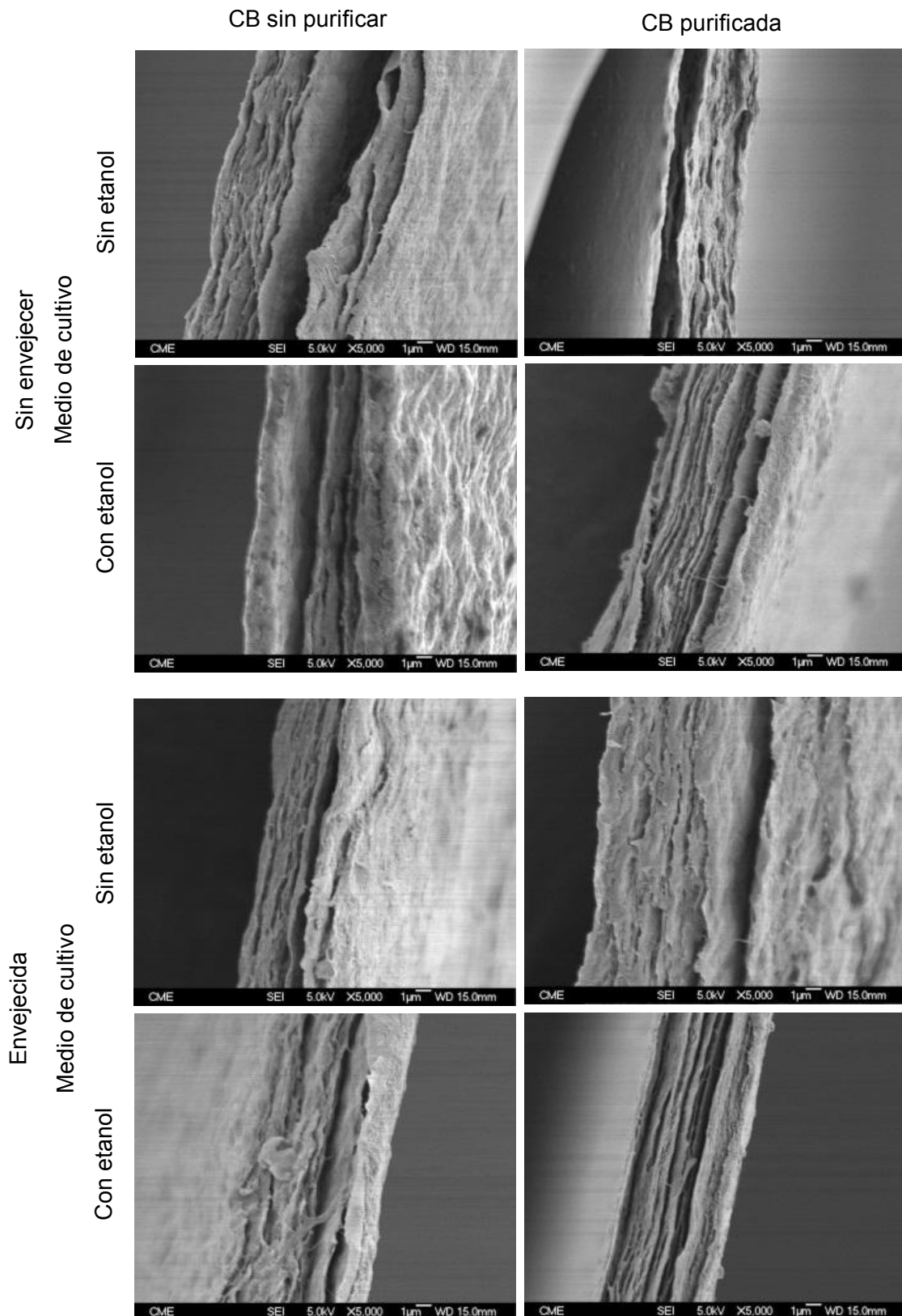
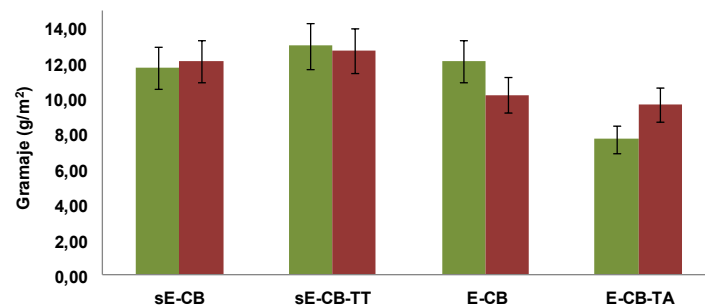


Figura 42. Imágenes SEM de las secciones transversales de las capas de celulosa bacteriana.

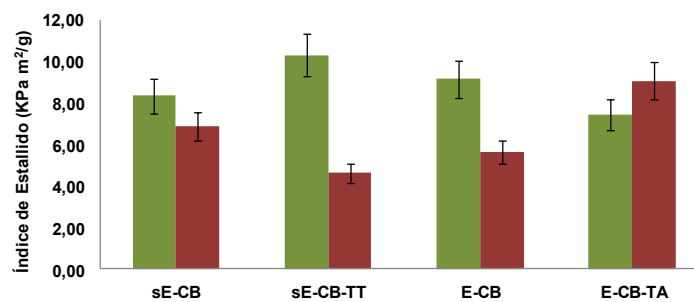
2.7.- Propiedades mecánicas y ópticas

Las propiedades mecánicas de las capas generadas, antes y después de los respectivos procesos de purificación, se muestran en la figura 43.

a)



b)



c)

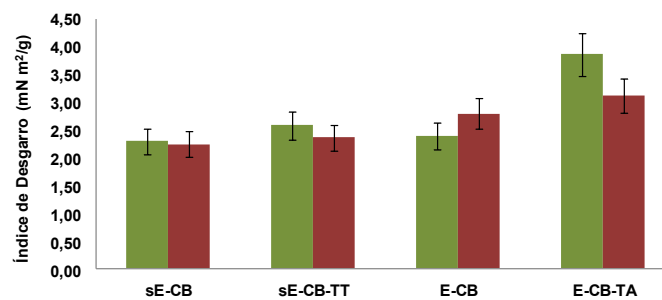


Figura 43. Propiedades mecánicas de las muestras de celulosa bacteriana. **a)** Gramaje, **b)** Índice de estallido, **c)** Índice de desgarro. Propiedades mecánicas. ■ Muestras Laminadas Envejecidas ■ Muestras Laminadas Sin Envejecer.

Como puede verse en la figura 43a, con la excepción de las capas tratadas con álcali (E-CB-TA), el gramaje es similar en todos los casos. Como ya se ha explicado anteriormente, el tratamiento alcalino lisa las paredes celulares, cosa que facilita la eliminación de la bacteria, así como celulosa de cadena corta, metabolitos y otras impurezas, lo que conlleva una disminución del peso de aproximadamente un 36%. Esto es coherente con los valores dados por George *et al.* (2005), que encontraron una disminución del gramaje de entre un 15 y un 20% cuando se trataba la celulosa bacteriana con hidróxido de sodio 0.2N. Los pequeños cambios en el gramaje observados con el envejecimiento, pueden atribuirse a que las muestras alcanzan el equilibrio de humedad a diferentes grados de humedad (Hotle *et al.*, 2008), debido al ciclo de histéresis de la celulosa.

Como se observa en la figura 43b y 43c, la celulosa bacteriana tiene un elevado índice de estallido y un aceptable índice de desgarro para ser usada en restauración de papel. En las muestras no tratadas no hay diferencias significativas entre los índices de estallido antes del envejecimiento; de la misma manera el índice de desgarro es bastante uniforme en las muestras no tratadas sin envejecer. Según Moon *et al.* (2011) el tratamiento con NaOH elimina impurezas y proporciona enlaces por puentes de hidrógeno más fuertes entre las microfibrillas de la celulosa. Esta purificación tiene como resultado un incremento significativo en la resistencia al desgarro (figura 43c), consistente con el incremento en la viscosidad descrito anteriormente, indicativos ambos de la integridad de la celulosa, pero este tratamiento alcalino también causa una pequeña disminución de la resistencia al estallido (figura 43b). El proceso de envejecimiento no produce diferencias en el índice de desgarro, sólo una disminución en las muestras E-CB-TA. Pero hay un importante descenso en el índice de estallido en las muestras sE-CB-TT y E-CB, que, sin embargo, se mantiene en valores mayores que los medidos habitualmente en papeles de celulosa vegetal.

Las propiedades ópticas de estas muestras se pueden ver en la tabla 12.

	Amarilleamiento (%)	Opacidad (%)	Blancura (%)
sE-CB			
Sin envejecer	21,42 ± 1,33	18,56 ± 1,55	45,60 ± 0,92
Envejecidas	40,17 ± 1,06	21,80 ± 1,22	34,75 ± 0,62
sE-CB-TT			
Sin envejecer	28,44 ± 1,79	21,75 ± 2,46	41,15 ± 1,04
Envejecidas	43,28 ± 0,56	26,14 ± 1,01	32,56 ± 0,28
E-CB			
Sin envejecer	26,77 ± 2,85	24,51 ± 1,48	42,81 ± 1,61
Envejecidas	34,97 ± 0,83	25,10 ± 1,50	38,51 ± 0,47
E-CB-TA			
Sin envejecer	-3,51 ± 0,96	16,01 ± 1,97	66,08 ± 0,51
Envejecidas	27,71 ± 1,48	20,27 ± 2,74	42,99 ± 0,61

Tabla 12. Propiedades ópticas de las muestras de celulosa bacteriana (media ± desviación estándar).

Comparando las dos muestras no tratadas, se puede observar que las capas generadas en presencia de etanol tienen mayor amarilleamiento y opacidad, y una blancura ligeramente menor. Estos hechos pueden atribuirse a la existencia de un número más elevado de células bacterianas y, también, de otros metabolitos debido a la presencia de etanol en el medio de cultivo (Li *et al.*, 2012).

El tratamiento térmico produce un aumento del amarilleamiento y un descenso en la blancura que es habitual cuando la celulosa sufre un proceso de envejecimiento térmico (Ardelean *et al.*, 2011). El tratamiento alcalino produce un descenso significativo del amarilleamiento y un importante aumento en la blancura, coherente con la discusión anterior, ya que este tratamiento produce una purificación significativa de las capas de celulosa. Además, este tratamiento causa un descenso importante de la opacidad, que, además de la eliminación de numerosos metabolitos y células, puede estar asociado a un descenso significativo del peso.

Los resultados del proceso de envejecimiento son similares en todas las muestras: un aumento en el amarilleamiento y un descenso en la blancura (como era de

esperar), y un ligero aumento de la opacidad consistente con la compactación de las capas observada en las micrografías, así como con el descenso de porosidad.

2.8.- Conclusiones

En resumen, se puede establecer que la celulosa bacteriana tiene un elevado índice de cristalinidad, una baja porosidad interna y buenas propiedades mecánicas. El tratamiento alcalino fomenta un incremento en la viscosidad, cristalinidad y pureza en las láminas de celulosa, y elimina las células bacterianas. Se observan propiedades ópticas y mecánicas notables en la celulosa así tratada. Por el contrario, el tratamiento térmico es menos agresivo, proporcionando capas de calidad similar a las no tratadas, aunque sí tiene lugar una ligera purificación que conlleva a una leve mejora en la viscosidad y en las propiedades mecánicas.

A la vista de los resultados se puede concluir que el envejecimiento causa un incremento de la cristalinidad y una disminución del volumen de poro. Estos datos son consistentes con los obtenidos con el tratamiento térmico. El tratamiento alcalino proporciona gran estabilidad en el tiempo en términos de ángulo de contacto, porosidad y cristalinidad. Tras el envejecimiento, la celulosa bacteriana tiene prácticamente el mismo índice de desgarro y un índice de estallido menor, que en cualquier caso permanecen más altos que los valores encontrados para papeles de celulosa vegetal.

Este capítulo de la tesis sugiere que la celulosa bacteriana es un material prometedor para la restauración de papel gracias a que sus características y su gran estabilidad en el tiempo indican que puede contribuir al refuerzo de los papeles degradados.

3.- PROCEDIMIENTOS DE RESTAURACIÓN

Una vez optimizado el medio de cultivo para los dos métodos de restauración definidos, y tras la purificación y caracterización de la CB obtenida en ambos casos, se procedió a aplicar esta celulosa al papel dañado según dichos métodos:

- (a) Producción de láminas de celulosa bacteriana y posterior aplicación al documento mediante el uso de adhesivos.
- (b) Generación directa de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar.

En ambos casos se caracterizó el material reforzado resultante y, en el caso del método (a), se comparó la capacidad de la celulosa bacteriana como material de refuerzo con la del papel japonés, material actualmente utilizado para este fin. Asimismo, se estudió la evolución en el tiempo de las propiedades del documento restaurado con ambos métodos, (a) y (b), mediante un proceso de envejecimiento acelerado.

3.1.- Papeles a restaurar

El material a restaurar se describió en el capítulo 1 de Materiales y Métodos, en el que se indica que los dos procedimientos de restauración que van a ser evaluados se han aplicado sobre papeles modelo (**F**, **M**, **Q**), y sobre ejemplares reales, ambos acondicionados según ISO 187:1990. La mayor parte de los documentos que deben ser reforzados son papeles antiguos. Sin embargo, en algunos casos puede ser necesario restaurar papeles nuevos que hayan sufrido deterioro. Para simular ambos casos, los papeles modelo seleccionados han sido sometidos a un proceso de envejecimiento acelerado (**F_E**, **M_E**, **Q_E**).

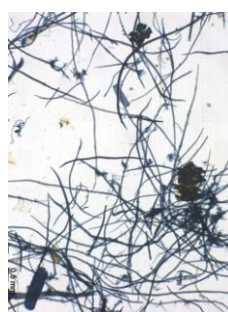
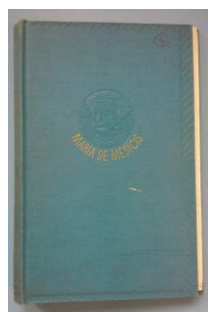
De entre los ejemplares reales adquiridos en el mercado de segunda mano y listados en el apartado 1 de Materiales y Métodos, se seleccionaron aquellos anteriores a 1970 por ser los más representativos del problema de la degradación. A estos nueve ejemplares se les hizo un estudio de composición fibrosa, resultando los siguientes datos (tabla 13):

MUESTRA	PASTA	TIPO	PORCENTAJE
1	Química	Conífera	50%
	Mecánica	Conífera	50%
2	Química	Conífera	85%
		Frondosa	5%
	Mecánica	Conífera	10%
3	Química	Conífera	95%
	Semiquímica	Conífera	5%
4	Química	Gramínea	100%
5	Química	Conífera	50%
	Mecánica	Conífera	50%
6	Química	Conífera	70%
		Gramínea	20%
	Semiquímica	Conífera	10%
7	Química	Conífera	10%
		Frondosa	10%
	Mecánica	Conífera	80%
8	Química	Conífera	5%
		Frondosa	40%
		Gramínea	50%
	Semiquímica	Frondosa	5%
9	Química	Conífera	50%
	Mecánica	Conífera	50%

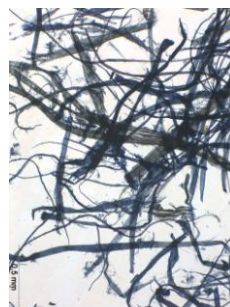
Tabla 13. Composición fibrosa de los libros anteriores a 1970.

Atendiendo a esta composición fibrosa, y con el objetivo de que fueran lo más ampliamente representativos, se seleccionaron los siguientes ejemplares: libro 4 (pasta química de gramíneas); libro 6 (mayoritariamente pasta química y semiquímica de conífera); y libro 7 (mayoritariamente pasta mecánica de conífera). Se denominaron, L_1 , L_2 y L_3 respectivamente para facilitar la nomenclatura. Los libros seleccionados y su composición fibrosa pueden verse en la figura 44. El pH superficial de todos ellos se encontraba en el intervalo de 4 a 5. Puesto que los libros se pueden considerar antiguos, no fueron sometidos a ningún proceso de envejecimiento adicional.

a)



b)



c)

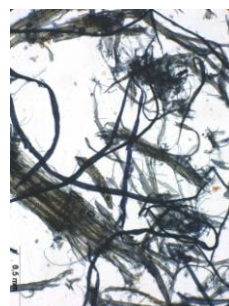
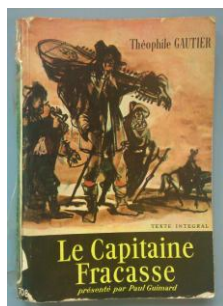


Figura 44. Portada y composición fibrosa de los libros. **a)** Libro 1, **b)** Libro 2, **c)** Libro 3.

3.2.- Laminación

Recordemos que laminación es un término general con el que se designa la fusión de capas finas de distintos materiales. En el contexto de la restauración documental, la laminación se refiere específicamente al proceso de fortalecer una hoja con otros materiales más fuertes. En esta tesis, y como ya se ha indicado previamente, estos materiales de refuerzo han sido papel japonés y celulosa bacteriana.

En esta parte del estudio se compararon inicialmente las propiedades de la celulosa bacteriana y del papel japonés, determinando su gramaje, espesor, resistencia al estallido y resistencia al desgarro. Se evaluaron también la permeabilidad al aire con un porosímetro Gurley, el ángulo de contacto estático, y las coordenadas CIELab. Posteriormente estos materiales fueron utilizados para laminar, tanto papeles modelo como ejemplares reales.

Para la producción de las capas de celulosa bacteriana se procede según lo descrito en el apartado 2.2.3 de Materiales y Métodos, siendo el medio de cultivo seleccionado el medio HS modificado, conteniendo fructosa como fuente de carbono, y extracto de levadura y extracto de maíz como fuentes de nitrógeno, más un 1% de etanol. Las capas de celulosa bacteriana se recolectaron tras 7 días de cultivo. El procedimiento de purificación para este método de aplicación fue un tratamiento con hidróxido de sodio al 1% seguido de un intenso lavado con agua destilada.

3.2.1.- Celulosa Bacteriana versus Papel Japonés

Para poder evaluar la capacidad de la celulosa bacteriana como material de refuerzo, primero se evaluaron y compararon varias de sus propiedades con las del papel japonés, el material de refuerzo más utilizado en la restauración de papel (Bansa e Ishii, 1997). Como se puede ver en la tabla 14, pese a que los dos materiales tienen un gramaje similar, las hojas de celulosa bacteriana son más delgadas. Se consideran materiales ventajosos para la restauración aquellos que sean relativamente delgados y fuertes (Owen *et al.*, 1988), ya que reforzarán el material degradado sin apenas aumentar

su espesor. Con respecto a las propiedades mecánicas, la resistencia al estallido es mayor en el caso de la celulosa bacteriana. Sin embargo, la resistencia al desgarró es significativamente mayor en el caso del papel japonés, que recordemos está constituido por fibras muy largas.

La permeabilidad al aire de estos materiales viene dada por los datos del porosímetro Gurley. Como se puede comprobar, la diferencia entre ambos materiales es notablemente elevada. Los valores para la muestra de celulosa bacteriana están por encima del límite superior del equipo (900 segundos), lo que indica una estructura muy cerrada que impide el flujo de aire. Por otro lado, el papel japonés muestra valores por debajo del límite inferior (5 segundos), lo que indica una estructura muy abierta que apenas limita el flujo de aire. Estos datos revelan la diferente porosidad de los materiales de refuerzo (Yamauchi y Murakami, 2001) y, por tanto, su diferente macro estructura: el papel japonés está formado por el entrecruzamiento de fibras vegetales de celulosa, resultando una estructura abierta, mientras que la celulosa bacteriana está formada por una red de nanofibras de celulosa (Torres *et al.*, 2013), que no deja espacios vacíos.

La mojabilidad de ambos materiales se evaluó mediante el ángulo de contacto con agua. Como puede verse en la tabla 14, el papel japonés posee un ángulo de contacto estático mayor que la celulosa bacteriana. Esta diferencia era esperable, ya que la medida del ángulo de contacto depende de factores relacionados con la estructura del papel y con la química de la superficie (Tåg *et al.*, 2009; Swain y Lipowsky, 1998). Estos datos confirman los resultados ya indicados por la permeabilidad al aire, es decir, que ambos materiales tienen una estructura notablemente distinta.

Las coordenadas colorimétricas $L^*a^*b^*$ (CIELab), describen todos los colores visibles al ojo humano, como ya se describió en el apartado 4.4.4 de Materiales y Métodos. Los valores de $L^*a^*b^*$ encontrados son similares para los dos materiales estudiados. Hay que recordar que, para la mayor parte de los papeles de impresión, los valores de L^* están próximos a 90 (elevada luminosidad) y los valores de a^* b^* cercanos a 0 (prácticamente sin color). Además, la baja opacidad implica que la apariencia colorimétrica de los documentos restaurados no será significativamente modificada.

En cuanto a los valores de brillo especular, los datos correspondientes al papel japonés están en el rango de los papeles para impresión sin estucar, mientras que los datos de la celulosa bacteriana son muy similares a los papeles estucados no brillantes. Estos distintos rangos son indicativos de que cada material podría utilizarse para restaurar distintos tipos de papeles.

	Celulosa Bacteriana	Papel Japonés
Gramaje ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$)	$7,7 \pm 0,68$	$9,0 \pm 0,11$
Espesor (μm)	$9 \pm 0,002$	$34 \pm 0,002$
Resistencia al estallido (kPa)	$57,00 \pm 4,28$	$33,00 \pm 2,54$
Resistencia al desgarro (mN)	$29,75 \pm 2,57$	$331,50 \pm 24,06$
Permeabilidad al aire (s)	>900	<5
Ángulo de contacto estático ($^{\circ}$)	$72,3 \pm 5,3$	$104,0 \pm 8,0$
L*	$84,18 \pm 0,19$	$88,49 \pm 0,07$
a*	$0,23 \pm 0,17$	$-0,65 \pm 0,01$
b*	$-1,69 \pm 0,49$	$1,69 \pm 0,02$
Opacidad (%)	$16,01 \pm 1,97$	$26,10 \pm 0,71$
Brillo especular (%)	28-36	4-5

Tabla 14. Caracterización del papel japonés y de la celulosa bacteriana (media \pm desviación estándar).

Tras el proceso de envejecimiento, todas las propiedades variaron menos de un 10% salvo en el caso de la coordenada b^* , que presentó un incremento mayor en ambos materiales, aunque nunca superó el 15%. El mayor aumento en la coordenada b^* indica un incremento en la intensidad del color amarillo, resultado esperado en cualquier proceso de envejecimiento de un material celulósico (Karlovits y Gregor-Svetec, 2011).

3.2.2.- Selección del adhesivo

La laminación se efectuó en los laboratorios de restauración de la Biblioteca Nacional de España siguiendo el método japonés tradicional, tal y como se explicó en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos. Diferentes tipos de adhesivos fueron ensayados utilizando pasta mecánica sobre la que se pegó, alternativamente, CB y PJ. El estudio se efectuó sobre papel de pasta mecánica, porque al conservar la práctica totalidad de la lignina puede ser la muestra más difícil de restaurar. Los adhesivos empleados y su método de preparación se explicaron en el apartado 5.1.1 de Materiales y Métodos. Se midieron las propiedades ópticas (tabla 15) y la resistencia al estallido (tabla 16) de los papeles reforzados para evaluar la bondad de los adhesivos.

		L*	a*	b*	Blancura (%)	Amarilleamiento (%)
CB	Almidón	75,86	3,05	31,32	26,08	63,48
	Tylosa MH300	74,07	4,63	30,23	24,82	64,38
	Tylosa MH4000	76,66	2,41	29,58	28,00	59,78
	Gelatina 80 Blooms	75,58	3,60	30,31	26,35	62,63
	Archibond	76,25	3,09	31,66	26,19	63,83
PJ	Almidón	80,42	1,94	19,05	40,42	40,05
	Tylosa MH300	80,85	2,06	19,41	40,76	40,67
	Tylosa MH4000	79,82	2,38	19,99	38,82	42,38
	Gelatina 80 Blooms	79,58	2,76	19,96	38,49	42,75
	Archibond	80,44	1,89	18,58	40,76	39,18

Tabla 15. Propiedades ópticas de hojas de pasta mecánica laminadas con celulosa bacteriana y papel japonés con distintos adhesivos (desviaciones estándar menores del 10%).

	Celulosa Bacteriana	Papel Japonés
Almidón	354,32 ± 27,18	159,37 ± 15,80
Tylosa MH300	338,76 ± 30,26	159,82 ± 13,89
Tylosa MH4000	389,51 ± 35,17	161,56 ± 13,57
Gelatina 80 Blooms	287,0 ± 16,25	152,5 ± 16,52
Archibond	226,5 ± 18,34	149,5 ± 12,59

Tabla 16. Resistencia al estallido (KPa) de hojas de pasta mecánica laminadas con celulosa bacteriana y papel japonés con distintos adhesivos (media ± desviación estándar).

Puede observarse que no hay grandes diferencias entre las propiedades ópticas con los distintos adhesivos ensayados, por lo que se optó por utilizar el más habitual en restauración, el almidón de trigo, que da, además, buenos resultados de resistencia al estallido.

3.2.3.- Papeles modelo laminados

3.2.3.1.- Propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas de las muestras laminadas es esencial para determinar la eficacia del proceso de laminado. La figura 45 muestra la resistencia al estallido y al desgarro de los papeles modelo sin envejecer (figura 45a y 45b) y envejecidos (figura 45c y 45d). En ningún caso la desviación estándar llegó al 10%. Cuando los papeles modelo, representados por las líneas horizontales, son sometidos a un proceso de envejecimiento, hay un ligero descenso tanto de la resistencia al desgarro como de la resistencia al estallido. Tras el laminado con celulosa bacteriana y papel japonés, hay un incremento similar en las propiedades mecánicas, tanto en el caso de los papeles modelo no envejecidos (figura 45a y 45b) como en los envejecidos (figura 45c y 45d). Cuando las muestras laminadas se envejecen, hay un descenso tanto en el

estallido como en el desgarro. Sin embargo, los valores finales de estas propiedades se mantienen por encima de los valores anteriores al laminado. Ardelan *et al.*, 2011, obtuvieron este mismo comportamiento respecto a la resistencia al estallido tras reforzar papeles modelo envejecidos (105 °C, 72h) con aditivos como carboximetilcelulosa, metilcelulosa o quitosano. El descenso en las propiedades mecánicas es particularmente pequeño en el caso de muestras hechas de pasta mecánica, **M** y **M_E**, que son las muestras más similares a los papeles reales a restaurar, debido a sus ya bajos valores originales. Esto indica una buena estabilidad de la restauración con el tiempo.

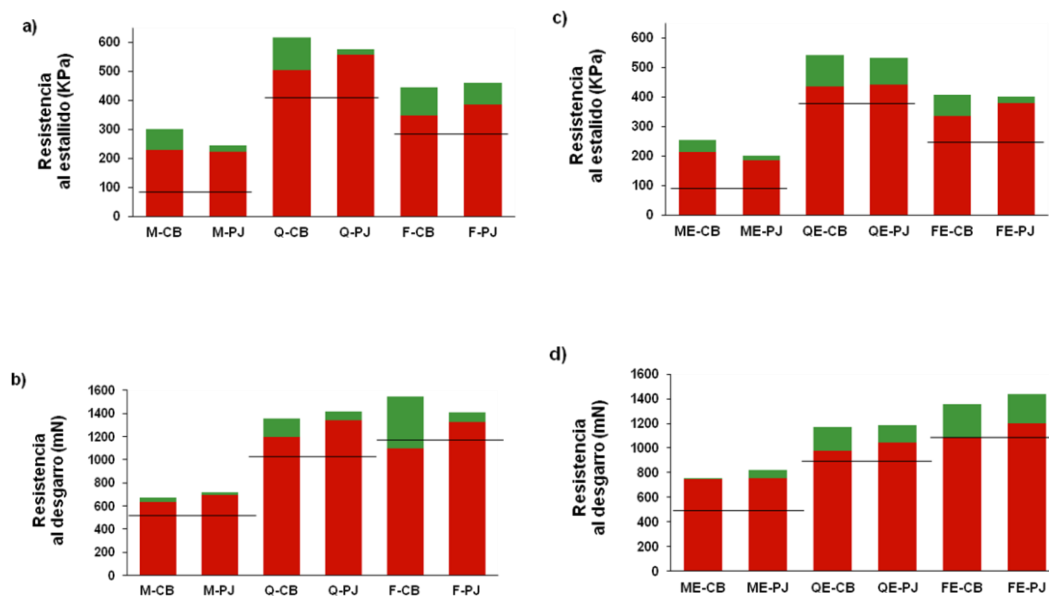


Figura 45. Las líneas horizontales representan los valores de los papeles modelo sin laminar.

a) Resistencia al estallido con papeles modelo sin envejecer, **b)** Resistencia al desgarro con papeles modelo sin envejecer, **c)** Resistencia al desgarro con papeles modelo envejecidos, **d)** Resistencia al desgarro con papeles modelo envejecidos.

■ Muestras Laminadas Envejecidas ■ Muestras Laminadas Sin Envejecer.

3.2.3.2.- Propiedades ópticas

Los valores de brillo especular se muestran en la tabla 17. A la vista de los resultados cabe destacar que es el material de refuerzo, independientemente del papel base usado, el que determina el brillo resultante. Así, el brillo en muestras laminadas con

celulosa bacteriana, siempre alcanza valores entre 15 % y 25 %, mientras que las muestras laminadas con papel japonés están en el rango de 4 % a 6 %. Con el proceso de envejecimiento el brillo varía menos de 6 puntos para todas las muestras ensayadas.

Cuando los papeles a restaurar son mate, como en esta tesis, la restauración con un material que también lo es, como el papel japonés, no modifica el rango del brillo de las muestras. Sin embargo, si los papeles a restaurar tuvieran un brillo mayor (semimate o papeles estucados brillo), la laminación con celulosa bacteriana conduciría a valores de brillo cercanos a los de los papeles originales.

Papel Modelo	Sin laminar	Laminado con Celulosa Bacteriana		Laminado con Papel Japonés	
		Sin envejecer	Envejecido	Sin envejecer	Envejecido
F	3,85	17,58	19,07	4,97	4,25
F_E	3,90	13,80	19,23	4,68	4,75
M	5,68	19,23	22,85	4,65	5,20
M_E	5,13	18,18	24,67	5,63	5,05
Q	6,20	15,05	15,93	4,58	4,63
Q_E	6,35	19,90	19,05	5,48	5,50

Tabla 17.- Brillo especular (%) de los papeles modelo y las muestras laminadas (desviaciones estándar menores del 5%).

La opacidad de los papeles modelo y las muestras laminadas con celulosa bacteriana y papel japonés, antes y después del proceso de envejecimiento, se muestran en la tabla 18. Como era de esperar, las hojas de pasta mecánica, tanto sin envejecer como envejecidas, tienen una opacidad mayor que las hojas de pasta química y el papel de filtro. Ni el proceso de laminado ni el de envejecimiento modifican la opacidad de la muestra **M** original. La opacidad de las hojas de papel de filtro y de pasta química, que es

menor antes de ser laminada, aumenta ligeramente con el tratamiento de refuerzo. En estos casos el proceso de envejecimiento se traduce en un incremento adicional. El mismo efecto encontró Van der Reyden *et al.* (1993) tras someter a papeles vegetales a un proceso de envejecimiento. También se describió en esta tesis un aumento de opacidad de la celulosa bacteriana con el envejecimiento (tabla 12).

Papel Modelo	Sin laminar	Laminado con Celulosa Bacteriana		Laminado con Papel Japonés	
		Sin envejecer	Envejecido	Sin envejecer	Envejecido
F	80,44	86,86	89,77	83,14	86,78
F_E	85,97	89,05	89,87	87,42	88,69
M	96,87	97,44	96,26	95,59	95,36
M_E	97,55	95,61	95,01	95,84	97,71
Q	71,12	78,51	55,33	75,21	80,70
Q_E	74,00	80,53	82,75	77,36	82,41

Tabla 18.- Opacidad (%) de los papeles modelo y las muestras laminadas (desviaciones estándar menores del 5%).

Se determinaron también las coordenadas colorimétricas, $L^*a^*b^*$ de las muestras. Los valores de a^* (eje rojo-verde), permanecieron en un estrecho margen cercano a cero. Los valores de L^* (luminosidad) y de b^* (eje azul-amarillo), están representados en la figura 46. Como era de esperar, cuando los papeles modelo se someten a un proceso de envejecimiento, L^* disminuye mientras que b^* aumenta, aunque en todos los casos las diferencias son menores a 5 puntos. Esto es consistente con los resultados previamente encontrados por Bansa e Ishii (1997), que estudiaron el efecto del envejecimiento en distintos tipos de papeles. Al laminar los papeles modelo con PJ, las modificaciones en ambas variables, L^* y b^* , son menores (menos de 1 punto). Sin embargo, cuando la CB se usa como material de refuerzo la modificación es un poco mayor, L^* disminuye en 1 punto en las hojas de pasta mecánica y en 5 puntos en los otros dos casos. La variable

b^* aumenta en 2 puntos en las hojas de pasta mecánica y aproximadamente 8 puntos en los otros casos.

Si el material de refuerzo es PJ y las hojas de pasta química y filtro han sido envejecidas previamente, las modificaciones en L^* y b^* son muy pequeñas (menos de 1 punto). La laminación con CB conlleva cambios próximos a los 5 puntos en ambos parámetros. Por otra parte, cuando se envejecen las hojas de pasta mecánica, los cambios son pequeños para la CB (aproximadamente de 1 punto) y mayores para el PJ (menos de 3 puntos). Si se observan los datos obtenidos con el envejecimiento tras la laminación, se puede ver que, en todos los casos, L^* disminuye de 1 a 4 puntos y b^* aumenta de 2 a 7 puntos, aunque no se observan diferencias significativas entre los papeles a restaurar ni con los materiales de refuerzo.

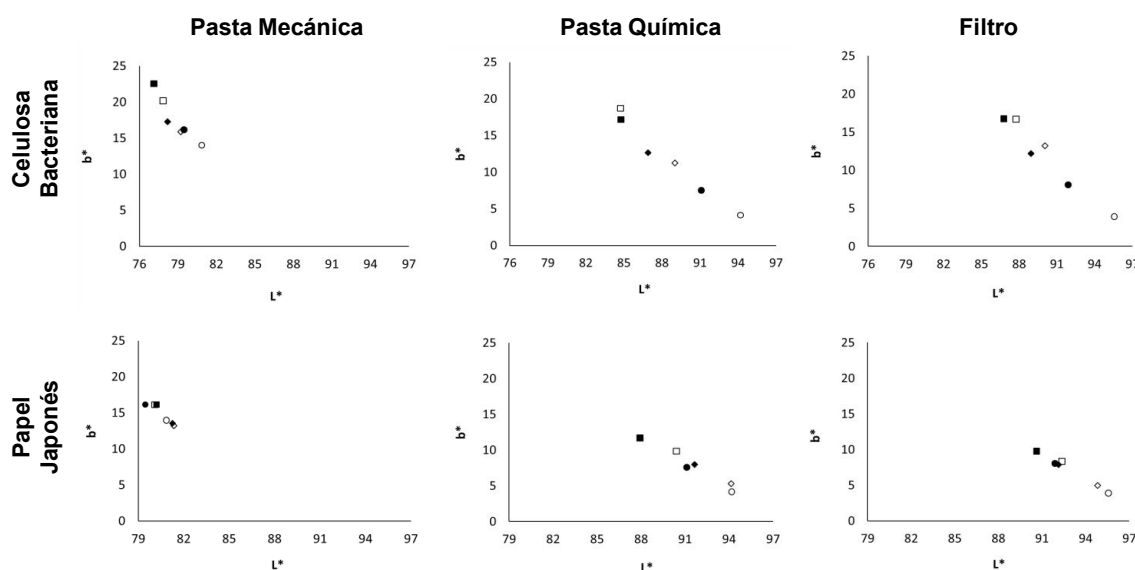


Figura 46.- Coordenadas L^* y b^* de los papeles modelo (○), muestras tratadas (◇), y muestras tratadas y envejecidas (□). Los símbolos aparecen en negrita cuando el papel modelo ha sido envejecido previamente.

A la vista de estos resultados, podemos decir que las propiedades ópticas no se modifican significativamente con el proceso de laminado, aunque cuando el papel japonés se usa como material de refuerzo los cambios son incluso menores que cuando

se usa celulosa bacteriana. Con ambos materiales de refuerzo las propiedades ópticas de todos los papeles laminados son bastante estables a lo largo del tiempo.

3.2.3.3.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se ha utilizado la técnica de microscopía electrónica de barrido, SEM, para observar la forma de unión entre los papeles modelo y los materiales de refuerzo. El estudio muestra que no hay diferencia ni entre papeles modelo ni con sus envejecidos. Por lo tanto, las imágenes de los refuerzos con papel japonés (figura 47) y celulosa bacteriana (figura 48) se muestran solo en el caso de las hojas hechas con pasta mecánica sin envejecer. La principal diferencia radica en la estructura de los materiales de refuerzo. Mientras que la celulosa bacteriana presenta una estructura en capas (figura 48), el papel japonés muestra la típica estructura en fibras del papel (figura 47). Los materiales de refuerzo se pueden ver a la izquierda de las imágenes. En ambos casos se puede observar que la unión con el papel modelo es muy íntima.

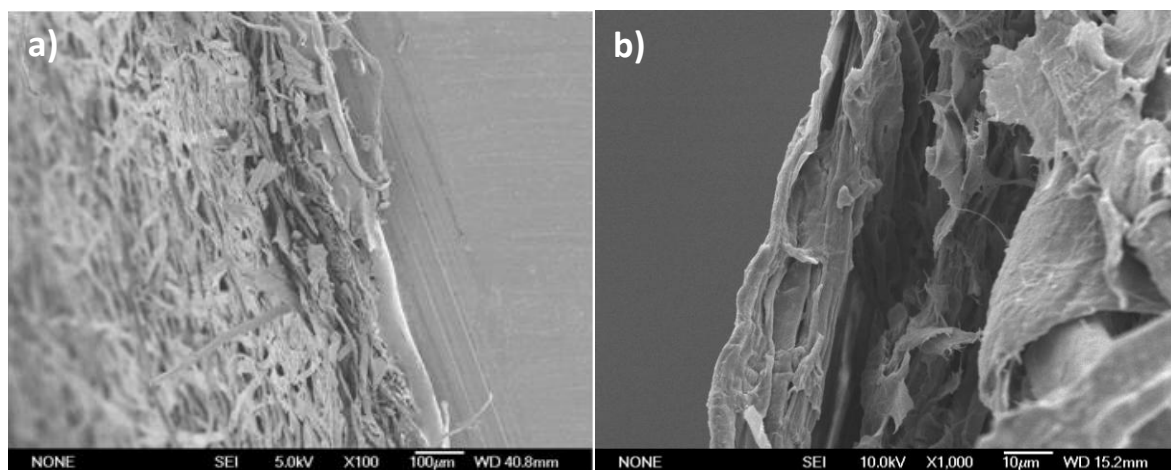


Figura 47.- Imágenes SEM a distintos aumentos de muestras de pasta mecánica reforzada con papel japonés. **a)** 100x, **b)** 1.000x.

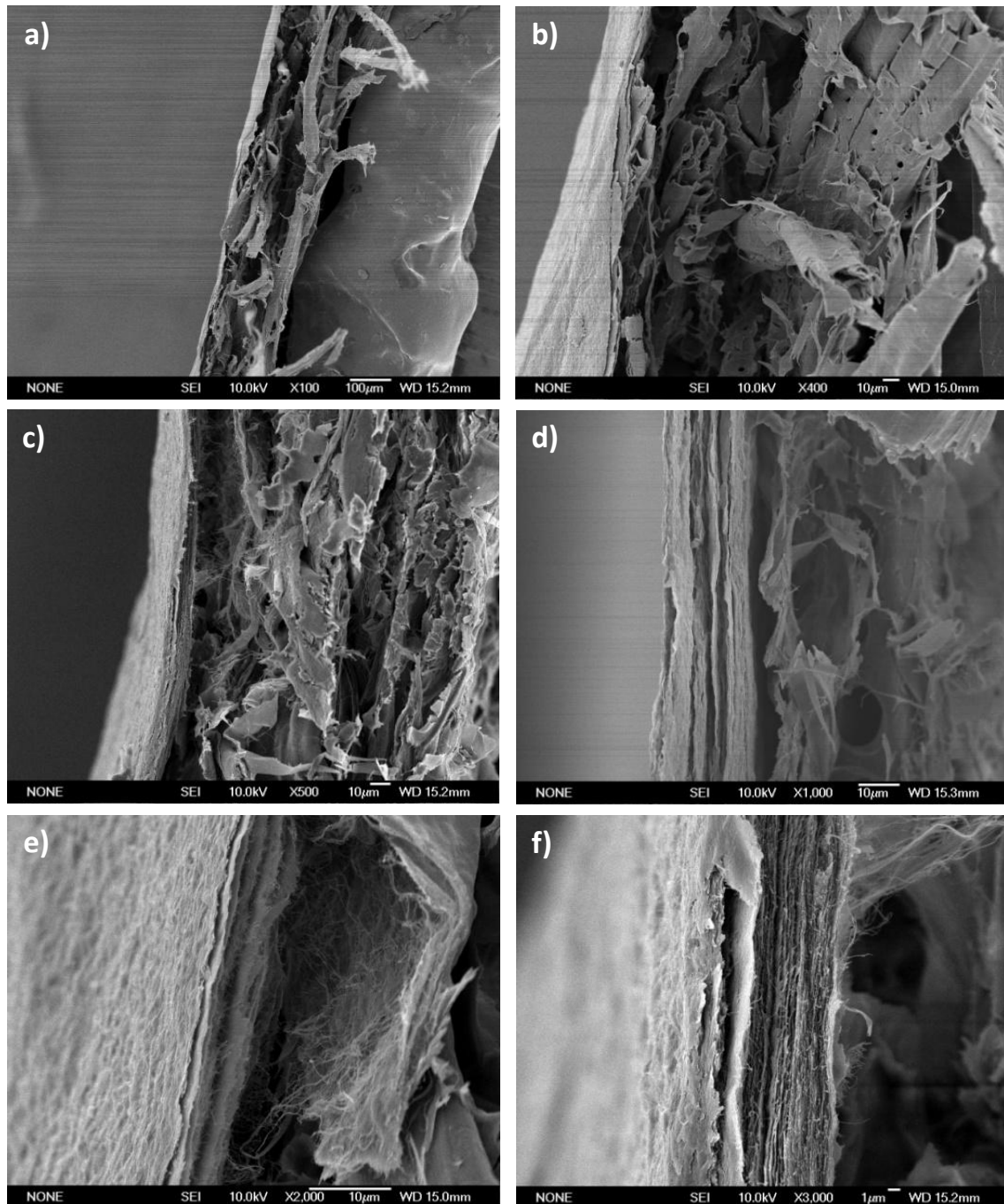


Figura 48.- Imágenes SEM a distintos aumentos de hojas de pasta mecánica reforzadas con celulosa bacteriana. **a)** 100x, **b)** 400x, **c)** 500x, **d)** 1.000x, **e)** 2.000x, **f)** 3.000x.

Las imágenes mostradas en la figura 48 fueron tomadas a distintos aumentos, observándose así la estructura en capas de la celulosa bacteriana y su unión con las hojas de pasta mecánica. Se pueden observar las nanofibrillas en el área de unión de ambos materiales, lo que puede ser un indicativo de la eficacia de esta unión. Esta suposición se corroboró mediante el ensayo de adhesión interna (TAPPI T569), que determina la fortaleza del papel en su dirección más estrecha, es decir, en el eje Z. Se ensayó la integridad de la superficie de enlace en las muestras laminadas, concluyendo que en todos los casos el papel modelo se dividía en dos capas, sin embargo, la unión entre los dos materiales, papel modelo-celulosa bacteriana, siempre permaneció intacta, es decir, el papel se rompía por la matriz de la celulosa vegetal sin que la celulosa bacteriana se separase de ella.

3.2.3.4.- Perfilometría láser

La topografía de las muestras se evaluó mediante perfilometría laser (LP). Teniendo en cuenta que la morfología de la superficie de los papeles modelo y de sus envejecidos era similar, sólo se muestran las imágenes de los primeros (figura 49).

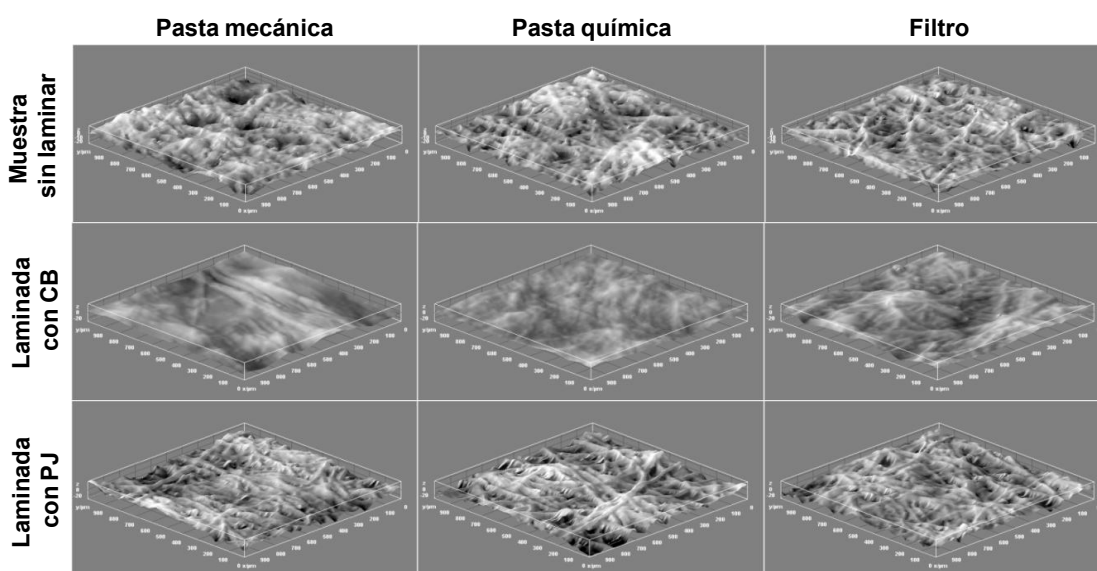


Figura 49.- Imágenes de Perfilometría Laser de las muestras sin envejecer, sin laminar y laminadas con celulosa bacteriana y con papel japonés.

Como puede observarse en la figura 49, la principal diferencia encontrada tenía que ver con los materiales de refuerzo. Las muestras laminadas con celulosa bacteriana mostraban una superficie más suave debido a la estructura de este material. La estructura fibrosa del papel japonés se puede observar claramente en el perfil de las muestras en las que se ha utilizado como material de refuerzo.

La perfilometría laser también se utilizó para cuantificar la microrrugosidad. Los resultados indican que la aplicación de la celulosa bacteriana reduce significativamente la rugosidad de la superficie en todos los papeles modelo (figura 50), confirmando los resultados previos. La topografía superficial es uno de los factores que influyen en el brillo especular de las muestras. El ángulo polar es relativamente elevado en todas las muestras, indicando un bajo nivel de brillo (4-25%). Esto concuerda con otros modelos previamente presentados por otros autores (Chinga-Carrasco, 2008b).

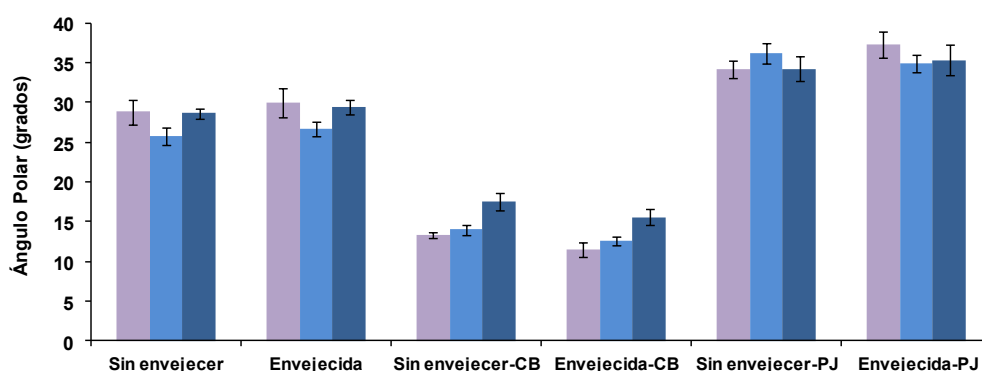


Figura 50.- Perfilometría Laser. Ángulo polar de las muestras. ■ Hojas de pasta mecánica
■ Hojas de pasta química ■ Filtro

3.2.3.5.- Porosidad Gurley

La diferencia estructural entre el papel japonés y la celulosa bacteriana, se ve también reflejada en los valores de permeabilidad al aire Gurley de las muestras laminadas. Los papeles modelo tienen una permeabilidad al aire de menos de 55 segundos. Cuando se lamina con celulosa bacteriana, los valores de permeabilidad al

aire Gurley exceden en todos los casos el límite superior de los valores considerados por la industria del papel (>900 segundos). Por el contrario, los papeles laminados con papel japonés muestran valores de permeabilidad al aire que en ningún caso superan los 75 segundos. Esto era de esperar, puesto que es el comportamiento que ya se observó en las capas de CB y de JP. En un estudio anterior, Yousefi *et al.* (2013) encontraron que, efectivamente, la CB no tiene permeabilidad al aire. El proceso de envejecimiento no modifica significativamente estos resultados. Esto indica que la estructura cerrada de la CB impide el paso del aire a través de las muestras, lo que podría resultar beneficioso para proteger a los papeles contra contaminantes atmosféricos.

3.2.3.6.- Ángulos de contacto estáticos y dinámicos

La mojabilidad de las muestras se estudió mediante la medida de los ángulos de contacto estáticos (α), y dinámicos (α_d), con agua destilada. Los valores de α se muestran en la tabla 19. El proceso de laminado provoca un incremento en los valores de α , lo que significa que mejora la resistencia al mojado de las muestras. El incremento de α es debido no solo al material de refuerzo (PJ o CB), sino también al almidón utilizado en el proceso de laminación, un agente encolante comúnmente utilizado en la industria del papel para reducir la mojabilidad de la superficie de éste (Moutinho *et al.*, 2004; Etzler *et al.*, 1995).

Las muestras laminadas con celulosa bacteriana y papel japonés muestran distinto tipo de comportamiento ante el mojado. Cuando el material de refuerzo utilizado es la CB, los valores de α obtenidos fueron independientes del papel modelo a restaurar, dando lugar a ángulos entre 70° y 87°. La CB tiene una baja porosidad (permeabilidad al aire Gurley > 900s, tabla 14) que hace que el almidón que se ha aplicado sobre ella permanezca en la superficie, alcanzando todas las muestras laminadas con CB un grado similar de encolado y, por tanto, de α . La variabilidad en el rango de α es probablemente debido a irregularidades en la superficie de las muestras (Tåg *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2008; Swain y Lipowsky, 1998), ya que la aplicación del almidón se hace manualmente y puede dar como resultado una superficie no del todo uniforme. Por el contrario, en el caso de las muestras laminadas con PJ los valores de α varían entre 55 ° y 93 °, lo cual supone un rango más amplio de variación. Esto es debido, no sólo a la aplicación manual

del almidón, sino también a la alta porosidad del PJ (permeabilidad al aire Gurley < 5s, tabla 14), que produce que el almidón en este caso migre de manera irregular hacia el interior del material, causando estas diferencias.

Papeles Modelo	Sin laminar	Laminados con Celulosa Bacteriana		Laminados con Papel Japonés	
		Sin envejecer	Envejecidos	Sin envejecer	Envejecidos
F	23,1	79,4	83,5	58,6	63,0
F_E	32,6	69,9	71,4	54,4	57,3
M	60,4	87,4	80,9	82,0	81,8
M_E	66,9	81,1	74,7	85,1	92,6
Q	52,0	75,7	63,4	92,4	71,9
Q_E	61,5	86,5	77,0	80,7	79,2

Tabla 19.- Ángulos de contacto estáticos (°) de los papeles modelo y las muestras laminadas (desviaciones estándar menores del 10%).

Teniendo en cuenta que los valores de α varían entre los tres papeles modelo originales, se puede concluir que los valores resultantes de α no se ven influidos por las propiedades de los papeles a restaurar cuando se utiliza la CB como material de refuerzo. Muy al contrario, para las muestras laminadas con PJ, las características de los papeles a restaurar parecen tener un efecto marcado sobre α .

En cuanto al efecto que el envejecimiento tiene en los valores de α , podemos observar que, para las muestras no laminadas, los valores de α aumentan con el envejecimiento. Sin embargo, para las muestras laminadas el comportamiento es irregular, en algunos casos este parámetro aumenta y en otros disminuye tras el proceso de envejecimiento. Este comportamiento puede estar relacionado con la reacción que sufre el almidón a altas temperaturas. Esto está en concordancia con Andersson *et al.* (2008), que descubrieron un aumento de α en un film de almidón cuando las condiciones ambientales cambiaron de 23 °C/50 % RH a 80 °C/70 % RH.

La mojabilidad de las muestras también fue estudiada examinando cómo cambian los valores de α con el tiempo (figura 51). Ya que el comportamiento frente a la mojabilidad de PJ y CB fue muy distinto, para poder comparar las muestras los valores de α se normalizaron en relación con los valores iniciales correspondientes, a 0 segundos. La figura 51 muestra las gráficas de la evolución de los valores de α normalizados para los papeles modelo no envejecidos, antes y después del proceso de laminado con CB y PJ.

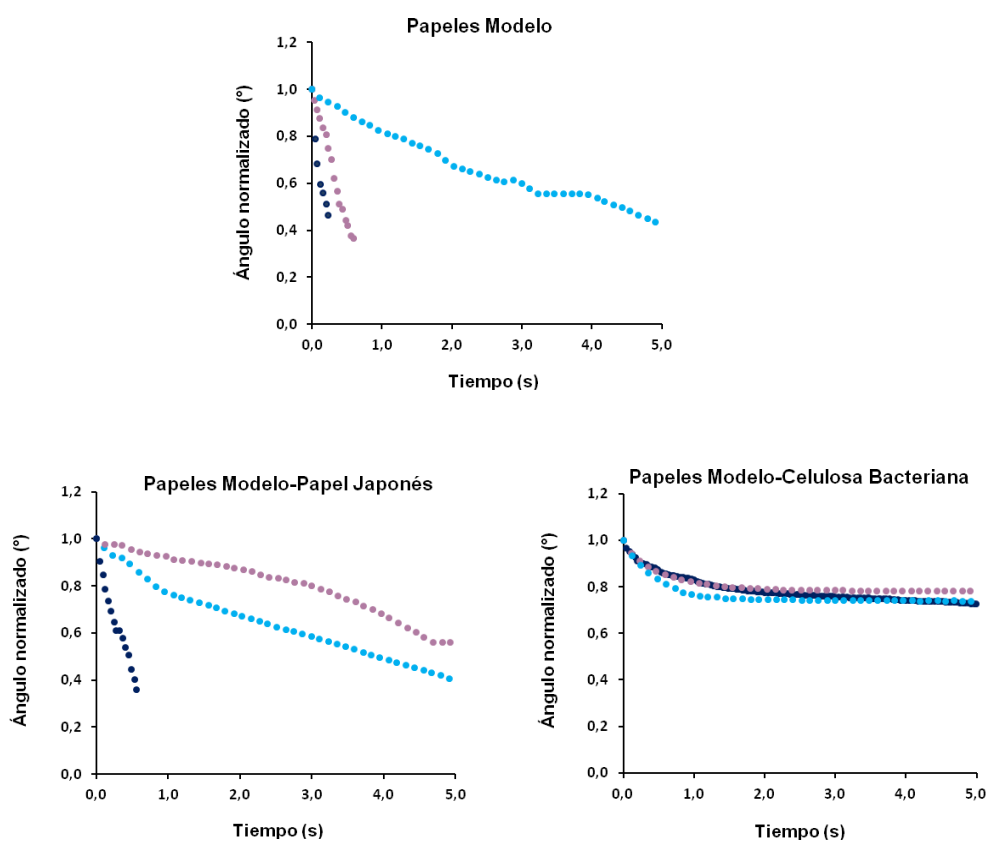


Figura 51.- Ángulos de contacto dinámicos de los papeles modelo no envejecidos y las muestras reforzadas. ■ Hojas de pasta mecánica, ■ Hojas de pasta química, ■ Filtro.

Como puede observarse, cada papel modelo tiene una mojabilidad dinámica diferente. El agua moja y se extiende más rápidamente en el filtro y en las hojas de pasta

mecánica que en las hojas de pasta química. La mojabilidad dinámica disminuye cuando las muestras se refuerzan con PJ, y mucho más aún cuando el material de refuerzo es CB. En el estudio de las capas de CB optimizadas, capítulo 2 de Resultados y Discusión, se encontró que las láminas de CB presentan tasas de mojado bajas, lo que confirma que la mojabilidad parece ser independiente del papel modelo utilizado. La evolución de los valores normalizados de α para los papeles modelo envejecidos, antes y después de ser reforzados con CB y PJ, sigue el mismo patrón.

La figura 52 muestra las tasas de mojado para cada muestra laminada. Todas las muestras laminadas con CB (figura 52a) muestran una tasa de mojado similar, oscilando entre $3,5 \text{ } \%.s^{-1}$ y $6,5 \text{ } \%.s^{-1}$. Por el contrario, las muestras laminadas con PJ (figura 52b) muestran valores mayores y más variables, de $6 \text{ } \%.s^{-1}$ a $14 \text{ } \%.s^{-1}$. No se han podido registrar datos para F-PJ y F_E-PJ porque en estas muestras el agua se absorbió rápidamente, permaneciendo las gotas en la superficie menos de 0,5 segundos.

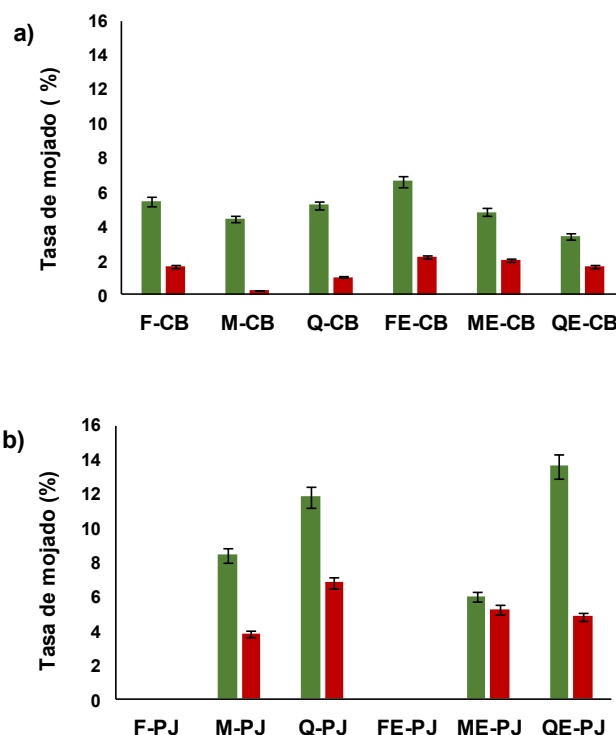


Figura 52.- Tasa de mojado a los 5 segundos para los papeles modelo y las muestras reforzadas.

a) Muestras laminadas con CB, **b)** Muestras laminadas con PJ.

■ Muestras Laminadas Envejecidas ■ Muestras Laminadas Sin Envejecer.

Para las muestras laminadas con CB la mojabilidad parece ser independiente de las propiedades del papel al que se aplica, mientras que dichas propiedades sí tienen una influencia notable en la mojabilidad de la muestra reforzada con PJ. Esto es consistente con los resultados previos obtenidos para α . Además, la figura 52 muestra que el proceso de envejecimiento hace disminuir la tasa de mojado en todas las muestras reforzadas. Esto puede ser debido al proceso de curado del almidón, que hace aumentar la hidrofobicidad de las muestras (Andersson *et al.*, 2008). Recordemos, además, que se produce un aumento de la cristalinidad de la CB con el envejecimiento, hecho que también puede contribuir a ese aumento de hidrofobicidad

3.2.3.7.- Conclusiones

Como conclusión de esta parte del estudio, podemos decir que la CB tiene ciertas características que podrían ser de interés en la preservación de material celulósico. En comparación con el PJ, comúnmente utilizado en los procesos de restauración y laminación, el espesor es menor con un gramaje similar. Además, las capas de CB tienen una mayor resistencia al estallido y una opacidad menor. Por otra parte, el PJ tiene mayor resistencia al desgarro. Ambos materiales muestran similares coordenadas colorimétricas, $L^*a^*b^*$. Debido a la diferencia de brillo de ambos materiales, cada uno de ellos se puede utilizar para restaurar diferentes tipos de documentos. La diferencia más importante se refiere a la permeabilidad al aire, en la que ambos materiales muestran comportamientos muy diferentes.

Independientemente del material de refuerzo (CB o PJ), no se encuentran diferencias importantes en los papeles laminados con respecto a la resistencia al estallido y al desgarro, la opacidad y las coordenadas colorimétricas L^* y a^* . Sin embargo, los papeles laminados con CB presentan valores de brillo más altos en todos los casos que los laminados con PJ. Por lo tanto, CB es adecuada para la restauración de diferentes grupos de papeles, incluyendo papel cebolla, papel estucado, pergamino y vitela. Además, la CB conduce a un aumento de la coordenada b^* , lo que indica una tendencia al amarilleo. Esto se puede considerar una ventaja si el papel para restaurar presenta alta amarillez, que es común en los papeles viejos.

Otra diferencia importante entre los dos materiales de refuerzo es la mojabilidad. En papeles laminados con PJ la mojabilidad disminuye, pero en papeles reforzados con CB este efecto es mucho más marcado e independiente del papel modelo al que esté reforzando. La disminución de la mojabilidad causada por CB está relacionada con su estructura mucho más cerrada y compactada, causante también de la reducción de la permeabilidad al aire.

Cuando los papeles laminados pasan por un proceso de envejecimiento, no hay cambios importantes en ninguna característica, salvo en las coordenadas colorimétricas b^* y L^* . Tales cambios son esperados debido al proceso de envejecimiento de la celulosa. También se puede observar que el proceso de envejecimiento disminuye la tasa de mojado en todas las muestras laminadas. Por lo tanto, la estabilidad en el tiempo de papeles modelo laminados con CB parece confirmarse.

3.2.4.- Libros laminados

Para validar la eficacia de la celulosa bacteriana como material de refuerzo para muestras reales, la laminación se efectuó en libros antiguos. Se adquirieron en mercados de segunda mano ejemplares sin valor documental similares a los ejemplares históricos a restaurar. La selección de los libros, como se dijo al principio de este capítulo, se efectuó según su composición fibrosa con el objetivo de que fueran lo más ampliamente representativos. Así, los libros sobre los que se realizó la restauración son los siguientes: libro 1, (L_1 , pasta química de gramíneas); libro 2 (L_2 , mayoritariamente pasta química y semiquímica de conífera); y libro 3 (L_3 , mayoritariamente pasta mecánica de conífera). El pH superficial de todos ellos se encontraba en el intervalo de 4 a 5. En este caso, al tratarse de ejemplares ya viejos, no fue necesario efectuar un envejecimiento acelerado previo, como se hizo en el caso de los papeles modelo. La laminación se efectuó con celulosa bacteriana y papel japonés en los libros y, tras ella, se sometió al material reforzado a un proceso de envejecimiento acelerado para evaluar su estabilidad con el tiempo.

3.2.4.1.- Propiedades mecánicas

La figura 53 muestra las propiedades mecánicas de las muestras laminadas, antes y después del proceso de envejecimiento, comparándolas con los valores previos al refuerzo. Las desviaciones estándar nunca superan el 10%. Como se puede observar, tanto la resistencia al desgarro (figura 53a) como la resistencia al estallido (figura 53b) aumentan con el laminado. Cuando las muestras se someten a un proceso de envejecimiento acelerado, la resistencia al desgarro disminuye pero nunca cae por debajo del valor original. Después del proceso de envejecimiento hay una disminución de la resistencia al estallido, pero en todos los casos sigue siendo mayor que en las muestras sin reforzar. Zou *et al.* (1996), encontraron que la degradación de la celulosa durante el envejecimiento conduce a la pérdida de propiedades mecánicas del papel.

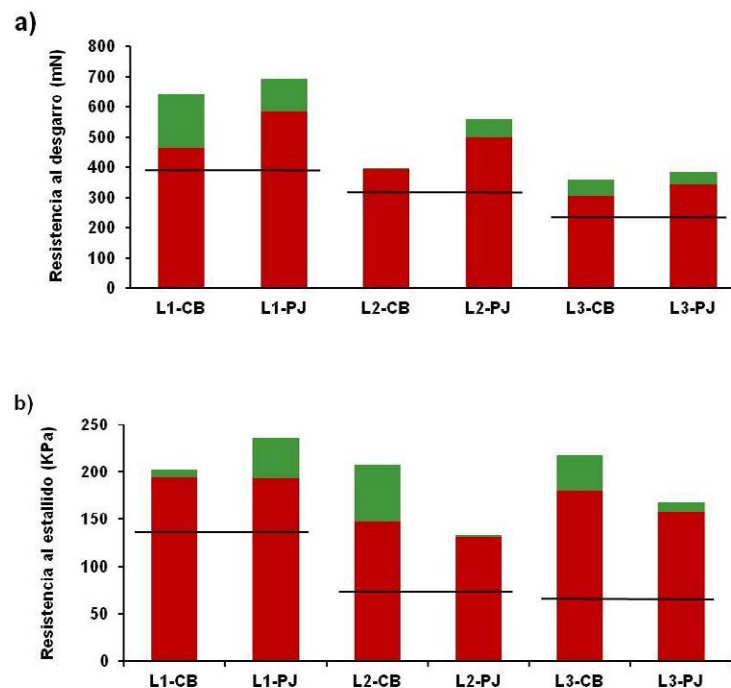


Figura 53. a) Resistencia al desgarro, **b)** Resistencia al estallido. ■ Muestras Laminadas Envejecidas, ■ Muestras Laminadas Sin Envejecer. Las líneas horizontales representan los valores originales de cada libro antes de la laminación.

En cuanto a la capacidad de la CB y del PJ para reforzar los papeles dañados, depende del material que se haya restaurado. Con los dos materiales de refuerzo, el libro L_1 muestra un alto incremento en la resistencia al desgarro y moderado en la resistencia al estallido, mientras que la mejora en el libro L_3 se consigue principalmente en términos de resistencia al estallido. Sin embargo, las principales diferencias en las propiedades mecánicas entre los materiales de refuerzo se encuentran en el libro L_2 , mostrando un incremento importante en la resistencia al desgarro solamente con JP, y un incremento mayor en la resistencia al estallido con CB que con PJ.

3.2.4.2.- Propiedades ópticas

Los valores de las propiedades ópticas de las muestras no laminadas, y las tratadas con CB y PJ antes y después del proceso de envejecimiento, se muestran en la tabla 20. En todos los casos la opacidad no sufre variaciones significativas, ni con el tratamiento de refuerzo ni con el proceso de envejecimiento. La laminación con CB produce un incremento del amarilleamiento, cosa que no ocurre cuando se lamina con PJ. El proceso de envejecimiento conlleva un incremento en el amarilleamiento, más notable en caso de laminar con CB. Este aumento podría explicarse porque la celulosa se oxida a una elevada temperatura en presencia de humedad, dando lugar a especies carbonilo, que absorben la luz azul (Lojewska *et al.*, 2007).

En el caso de la blancura, ésta cae cuando se utiliza CB como material de refuerzo, pero esta caída no ocurre, o lo hace moderadamente, si se utiliza PJ. El proceso de envejecimiento siempre causa una pérdida de blancura, que es más pronunciada con CB. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la caracterización de las capas de CB, capítulo 2 de Resultados y Discusión, en el que se observó un incremento en el amarilleamiento y una disminución en la blancura después de un proceso de envejecimiento. Si el proceso de laminado se realiza con PJ, los valores del brillo especular se mantienen cercanos a los originales. Por otro lado, el uso de CB para reforzar las muestras conduce a una modificación en esta propiedad, aunque los valores de ganancia de brillo son moderados y no afectan a la legibilidad de los textos.

		Amarilleamiento (%)	Opacidad (%)	Blancura (%)	Brillo (%)
Libro 1	Sin laminar	28,99	97,81	53,65	4,35
	CB	Sin envejecer	37,15	95,19	44,24
		Envejecido	50,69	95,05	31,64
	PJ	Sin envejecer	24,63	96,72	53,67
		Envejecido	34,19	98,32	43,59
	CB	Sin envejecer	41,73	95,68	38,72
		Envejecido	49,59	93,18	33,65
	PJ	Sin envejecer	27,63	96,88	48,56
		Envejecido	35,50	94,43	44,53
Libro 2	Sin laminar	28,32	98,40	49,71	5,20
	CB	Sin envejecer	41,73	95,68	38,72
		Envejecido	49,59	93,18	33,65
	PJ	Sin envejecer	27,63	96,88	48,56
		Envejecido	35,50	94,43	44,53
	CB	Sin envejecer	45,82	88,64	30,14
		Envejecido	63,04	91,77	22,32
	PJ	Sin envejecer	49,39	92,32	33,91
		Envejecido	50,31	92,83	30,73
Libro 3	Sin laminar	45,80	89,73	36,62	7,15
	CB	Sin envejecer	45,82	88,64	30,14
		Envejecido	63,04	91,77	22,32
	PJ	Sin envejecer	49,39	92,32	33,91
		Envejecido	50,31	92,83	30,73
	CB	Sin envejecer	45,82	88,64	30,14
		Envejecido	63,04	91,77	22,32
	PJ	Sin envejecer	49,39	92,32	33,91
		Envejecido	50,31	92,83	30,73

Tabla 20.- Propiedades ópticas de las muestras originales y laminadas con CB y PJ antes y después del proceso de envejecimiento (las desviaciones estándar fueron menores del 5%).

3.2.4.3.- Estudios microscópicos

Los resultados de las propiedades ópticas podrían sugerir que, según éstas, el PJ es más apropiado para laminar que la CB, debido a que causa cambios menores en el material original. Sin embargo, estas propiedades se han determinado en las áreas no impresas del papel, mientras que la observación microscópica de las áreas impresas se puede observar en la figura 54.



Figura 54.- Microfotografías tomadas observando el libro 1 con un microscopio estereoscópico (primera y segunda filas) y un microscopio óptico (última fila).

Se encontró que laminar con PJ reduce la legibilidad del texto. Como se puede observar, las letras cubiertas con CB son totalmente legibles, mientras que si se refuerza con PJ las fibras que lo forman interfieren con las letras acarreado pérdida de legibilidad. Este efecto es debido a la ya mencionada estructura cristalina de la CB. Ya que este mismo comportamiento se observa en los tres libros, solamente se muestra el L₁.

La morfología de las hojas reforzadas se estudió mediante SEM (figura 55). El estudio reveló que en todos los casos el vínculo entre el material de refuerzo y las hojas originales era muy íntimo. La principal diferencia que se observa entre CB y PJ, es que, como ya se ha mencionado, la primera está estructurada en capas lisas, mientras que PJ tiene una estructura fibrosa (figura 55). Al igual que en el caso anterior, este comportamiento se observa en los tres libros, con lo que en la figura 55 solamente se muestra el L₁. Como se describe a continuación, esta diferencia estructural provoca cambios considerables en varias propiedades, tales como la porosidad y la mojabilidad.

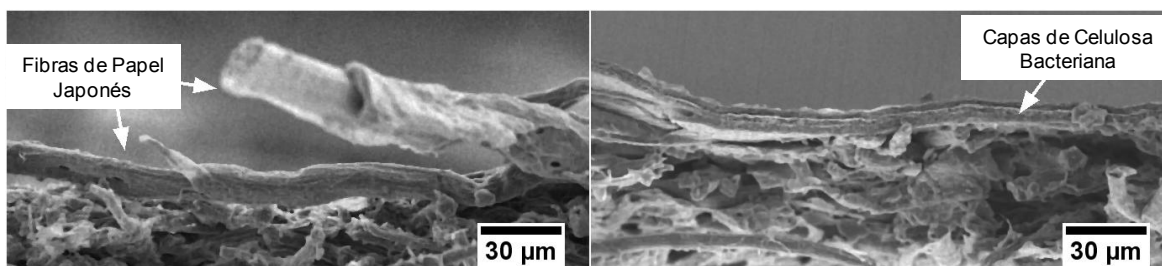


Figura 55.- Imágenes SEM de las secciones transversales de las hojas reforzadas del libro 1.
Fibras del papel japonés (izquierda). Capas de CB (derecha).

3.2.4.4.- Perfilometría láser

La topografía de las muestras se evaluó mediante perfilometría láser (LP). La morfología de la superficie de los libros laminados y sus envejecidos fue similar, con lo que en la figura 56 se muestran sólo las imágenes LP de los primeros. La principal diferencia observada se debe al material de refuerzo. Contrariamente a la superficie áspera que origina la estructura fibrosa de PJ, las muestras laminadas con CB poseen

una superficie más lisa (figuras 55 y 56). Los resultados de la perfilometría láser indican que la aplicación de CB reduce la rugosidad de la superficie de manera significativa en todos los libros ensayados.

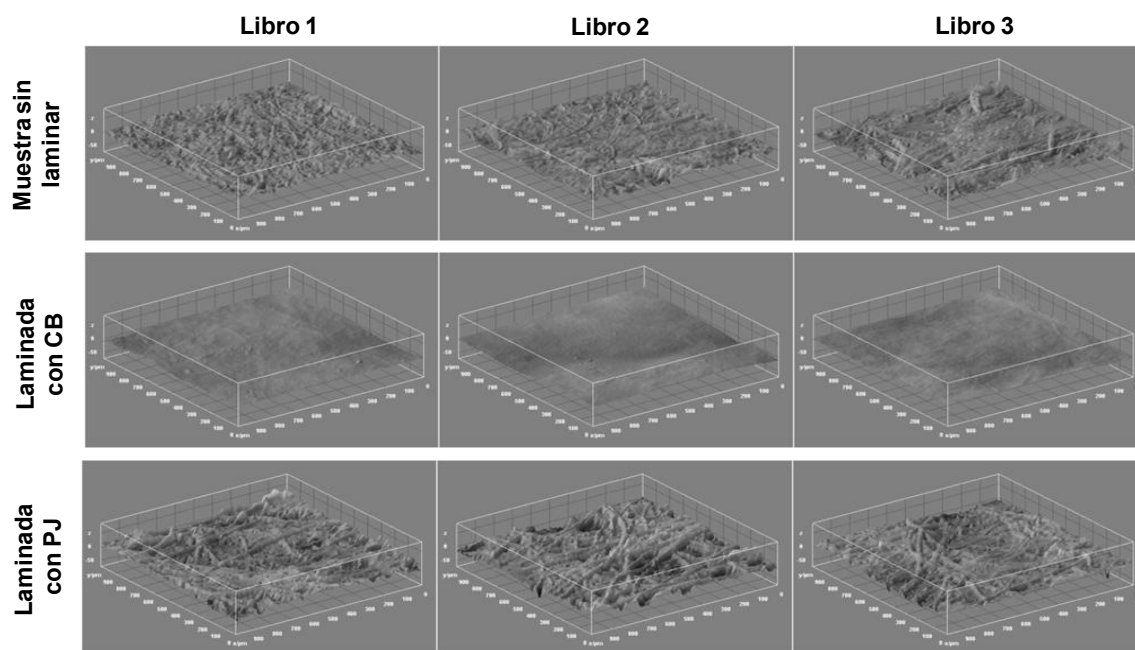


Figura 56.- Imágenes LP de las muestras sin envejecer sin laminar y laminadas con CB y PJ

Con el fin de conocer con más profundidad cómo el material utilizado para el revestimiento afecta a la morfología de la superficie, se evaluó la rugosidad determinada por LP en varias longitudes de onda (figura 57). Los resultados confirman el efecto “suavizante” que la CB provoca en la estructura de la superficie. El efecto se evidencia claramente para longitudes de onda por debajo de 40-80 μm , lo que indica que la capa de CB está llenando las cavidades creadas entre las fibras de los libros originales. Por otra parte se confirmó la estructura más áspera creada por la capa de PJ. La topografía de la superficie es uno de los factores que afectan a la apariencia brillante del papel. La superficie más lisa creada por la capa de CB aumenta los niveles de brillo desde 4-7% (dependiendo del papel del libro) hasta 18-28% (figuras 56 y 57, tabla 20). Las fibras más ásperas de PJ aumentan la rugosidad y por lo tanto causan una ligera disminución en los niveles de brillo.

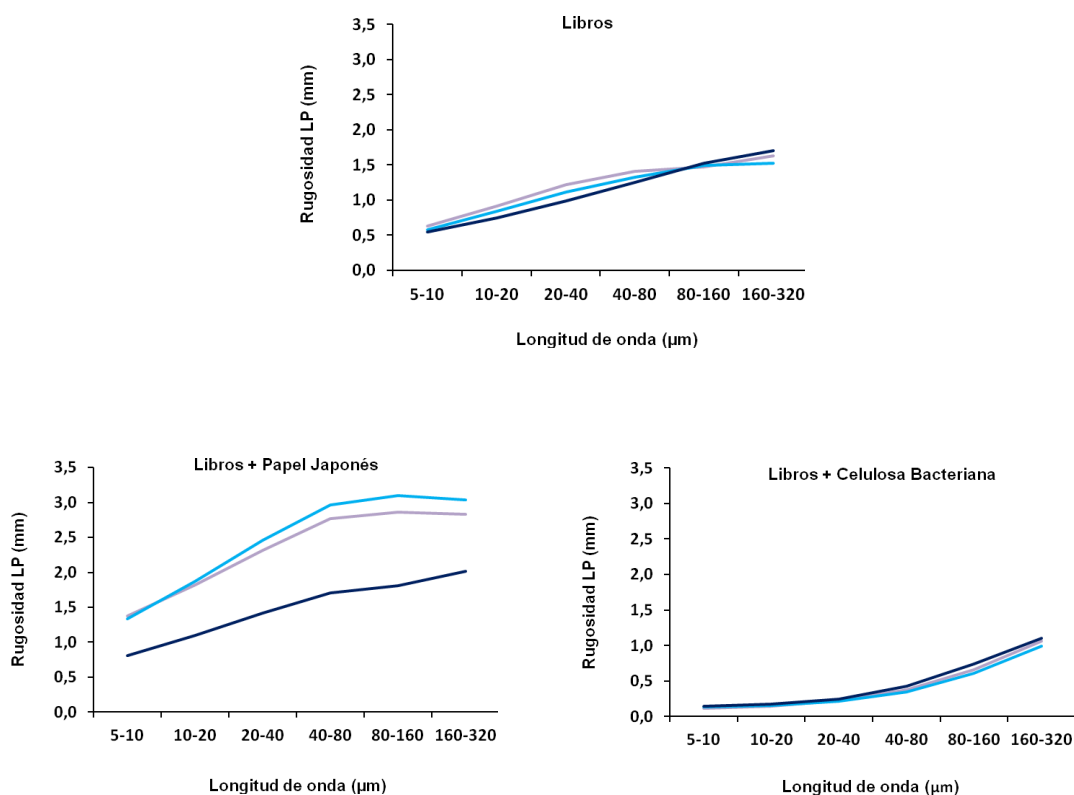


Figura 57.- Rugosidad de la superficie en función de la longitud de onda obtenida por perfilometría láser. ■ Libro1, ■ Libro2, ■ Libro3.

3.2.4.5.- Porosidad Gurley

La influencia de la estructura de la celulosa bacteriana en la permeabilidad al aire de las muestras, se evaluó a través de la porosidad Gurley. Todos los libros originales tienen valores de permeabilidad al aire Gurley en el rango de 20-40 segundos. Cuando se reforzaron con papel japonés estos valores no variaron significativamente, ni siquiera después del proceso de envejecimiento. Por el contrario, cuando los papeles fueron reforzados con celulosa bacteriana, los valores de permeabilidad al aire Gurley fueron siempre superiores a 900 segundos. Este resultado indica que la estructura cerrada de la celulosa bacteriana impide el flujo de aire a su través, lo que está en concordancia con lo encontrado para papeles modelo. El refuerzo con CB podría resultar eficaz en la

protección de los libros contra los contaminantes atmosféricos, como ya se dijo en el apartado 3.2.3.5, que son agentes importantes de la degradación del papel (Area y Cheradame, 2011).

3.2.4.6.- Ángulos de contacto estáticos y dinámicos

Los ángulos de contacto estáticos (α) se muestran en la tabla 21. Todos los libros originales tienen valores de α altos, lo que significa alta hidrofobicidad. El alto grado de encolado de los libros podría explicar este comportamiento, ya que los agentes de encolado tienen baja afinidad por el agua (Moutinho *et al.*, 2004; Etzler *et al.*, 1995).

Los valores de α de las muestras laminadas están influidos, no sólo por los materiales de refuerzo, sino también por el almidón que se utiliza como adhesivo. En el estudio de los papeles modelo ya observamos que los valores de α de las muestras laminadas con celulosa bacteriana no dependían del papel modelo a restaurar. Esto era debido a la baja porosidad de la CB, que causaba que el almidón se mantuviera en la superficie. En cambio la porosidad del papel japonés es muy elevada, por lo que el almidón migraba desde la superficie hasta el interior de la estructura del papel modelo. En este caso los valores de α sí dependían del papel para restaurar. Esta misma tendencia se observa en el caso de reforzar libros, ya que aunque laminar con PJ conduce a una ligera disminución de los ángulos de contacto, no todos ellos disminuyen en la misma proporción. La CB produce una mayor disminución de α , pero en todos los casos es moderada y, además, alcanzando valores similares en todos ellos (alrededor de 90°).

Después del proceso de envejecimiento, los ángulos de contacto estáticos disminuyen en 10° en todas las muestras tratadas con CB, mientras que con PJ el comportamiento es irregular. Se puede concluir que debido a la estructura laminar cerrada de la CB, ésta proporciona propiedades superficiales estables a los papeles reforzados, sin tener en cuenta la naturaleza del papel deteriorado.

	Sin laminar	CB		PJ	
		Sin envejecer	Envejecido	Sin envejecer	Envejecido
Libro1	122,6 ± 4,1	89,1 ± 8,7	80,9 ± 7,0	99,3 ± 5,9	106,5 ± 3,6
Libro 2	121,4 ± 2,7	88,7 ± 4,6	78,5 ± 5,3	117,7 ± 3,1	116,2 ± 4,5
Libro 3	118,6 ± 3,7	91,5 ± 4,0	82,6 ± 5,7	101,1 ± 3,0	102,9 ± 6,2

Tabla 21.- Ángulos de contacto estáticos de las muestras sin envejecer y envejecidas, sin laminar y laminadas con celulosa bacteriana y papel japonés (medias ± desviaciones estándar).

La mojabilidad de las muestras se evaluó con los valores de ángulo de contacto dinámico. Para comparar el efecto de los tratamientos, dichos valores se normalizaron en relación a los valores iniciales correspondientes a 0 segundos (figura 58).

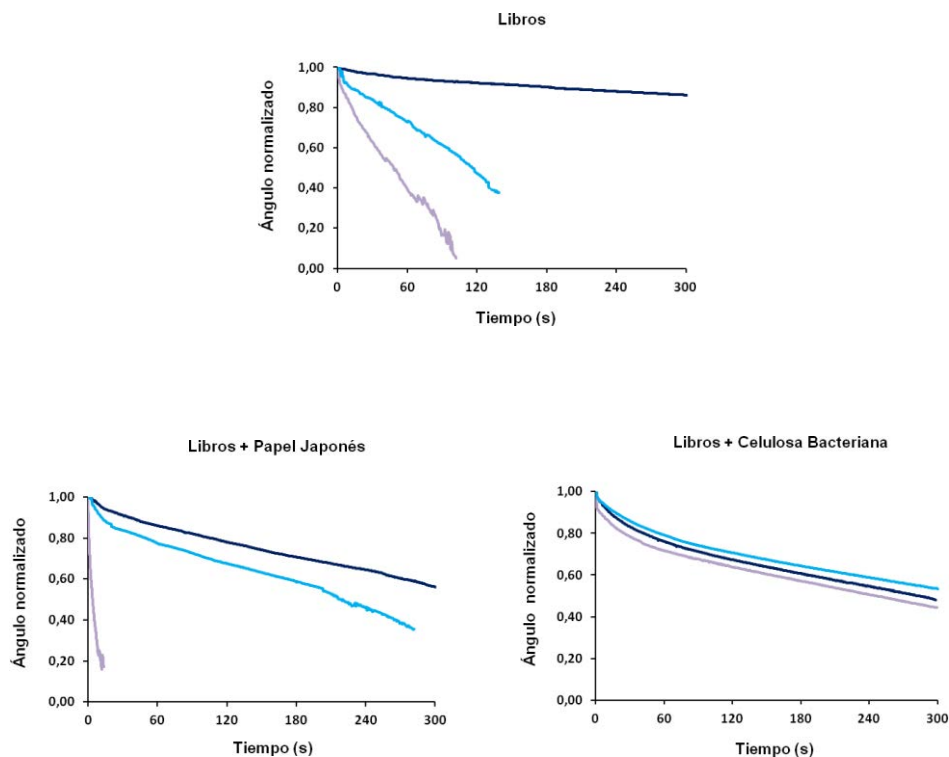


Figura 58.- Ángulos de contacto dinámicos de las muestras laminadas y sin laminar.

■ Libro 1 ■ Libro 2 ■ Libro3

Como se puede observar en la figura, cada libro tiene una capacidad de mojabilidad diferente, que se mantuvo cualitativamente cuando el papel se reforzó con papel japonés. En el caso de ser laminados con celulosa bacteriana, los tres libros analizados mostraron un comportamiento similar, esto significa que la mojabilidad resultante parece ser independiente del papel para restaurar, lo que confirma los resultados anteriores.

3.2.4.7.- Conclusiones

Este estudio sugiere que la CB es un material prometedor para la restauración de documentos en papel, ya que sus características y su alta estabilidad en el tiempo indican que puede contribuir al refuerzo del papel degradado.

Las propiedades mecánicas mejoran con el laminado con CB, los índices de desgarro y estallido aumentan o, al menos, siguen siendo similares al valor original, incluso después de que el proceso de envejecimiento. Si nos fijamos en las propiedades ópticas podemos concluir que el laminado con PJ modifica muy poco las características originales. Sin embargo, la legibilidad de los textos es mucho mejor cuando los libros se refuerzan con CB, lo cual es muy importante cuando los documentos para restaurar tienen un alto valor histórico.

Como los papeles para restaurar deben ser conservados por ser valiosos, es aconsejable tener un material de refuerzo con una estructura muy cerrada, con el fin de proteger los documentos de la humedad y los contaminantes atmosféricos, que son dos de los más importantes agentes causantes de la degradación del papel. La CB proporciona una protección adecuada para evitar estos posibles agentes de degradación, con independencia del papel a restaurar.

3.3.- Generación de celulosa bacteriana *in situ*

Reciben el nombre de materiales compuestos aquellos que se forman por la unión de otros dos para conseguir la combinación de propiedades que no es posible obtener en los materiales originales. Uno de los dos materiales que forman parte de la unión es la matriz y el otro es el material de refuerzo, que proporciona propiedades fisicoquímicas y biológicas a la matriz. Una de las estrategias de síntesis de compuestos de polímeros es la denominada *in situ*, que utiliza la adición de material de refuerzo al polímero durante su síntesis, que se convierte en parte del polímero estructura (Saibuatong y Philsalaphong, 2010; Serafica *et al.*, 2002).

Hay estudios que indican que la nanocelulosa es un buen agente de refuerzo para el diseño de nanocompuestos (Klemm *et al.*, 2011; Nakagaito *et al.*, 2005). En el método de restauración que ahora se propone, se utiliza celulosa bacteriana como material de refuerzo, evaluando la posibilidad de efectuar el cultivo de la cepa bacteriana elegida sobre los papeles a restaurar (apartado 3.1 de Resultados y Discusión). De esta manera se promueve la formación de enlaces entre la celulosa vegetal existente y la celulosa que va siendo excretada por las bacterias, evitando el uso de un adhesivo y simplificando, además, el método de restauración. Para ello, el inóculo ha de ser añadido, junto con el medio de cultivo, directamente sobre la muestra a restaurar.

Algo similar describen Meftahi *et al.*, (2010), que colocaron gasas de algodón en placas Petri a las que añadieron medio de cultivo HS y células bacterianas de *A. xylinum*. Tras seis días de cultivo estático recogieron las gasas y las lavaron con agua destilada. Comprobaron que la celulosa crecida durante ese tiempo formó una película entre los espacios de la gasa de manera uniforme. También Wu *et al.* (2012) utilizaron films de celulosa bacteriana para reforzar telas de seda antiguas, en lugar de los polímeros sintéticos utilizados tradicionalmente. En dicho estudio se usaron tanto muestras de seda histórica como muestras de seda envejecida artificialmente. Las muestras restauradas con CB también fueron, a su vez, envejecidas artificialmente. La manera de aplicar las células de *A. xylinum*, junto con el medio de cultivo sobre las muestras de seda, fue mediante el uso de un spray. Se mantuvo el cultivo a 30°C y 90% de humedad relativa durante 15 horas, tiempo tras el cual se calentaron las muestras a 60° C durante 1 hora

para inactivar las células bacterianas, se lavaron intensamente con agua desionizada para eliminar las células, y se secaron al aire.

Como ya se describió en el capítulo 2.2.3.2 de Materiales y Métodos, para efectuar la generación *in situ* de celulosa bacteriana, se ensayaron distintos métodos de aplicación a la misma concentración que la utilizada para obtener capas de CB, es decir, 250 μ L de inóculo en 100 mL finales del medio de cultivo HS optimizado para este método de restauración. Este medio, obtenido en el capítulo 1 de Resultados y Discusión, contenía fructosa como fuente de carbono, y extracto de levadura y extracto de maíz como fuentes de nitrógeno. Los papeles a restaurar fueron esterilizados en autoclave. Todo el proceso de restauración se llevó a cabo en condiciones estériles utilizando una cabina de flujo laminar. Los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares fueron los siguientes:

- 1.- Capilaridad. No se formaba capa de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar.
- 2.- Inmersión. Si bien se formaba una capa de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar, las uniones entre ambos eran muy débiles y la capa de celulosa bacteriana se separaba muy fácilmente de la celulosa vegetal.
- 3.- Contacto con el medio sólido. Sí se formaba capa de celulosa bacteriana.
- 4.- Contacto con medio semisólido. Sí se formaba capa de celulosa bacteriana pero las uniones que se establecieron entre ella y la celulosa vegetal eran muy débiles.
- 5.- Aplicación con pulverizador. Sólo se formaba capa de celulosa bacteriana en el caso de la existencia de cámara húmeda pero, en este caso, la capa formada era extremadamente heterogénea.
- 6.- Aplicación con pincel. Se formaba capa de celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar, tanto si había cámara húmeda como si el cultivo se efectuaba sin ella.
- 7.- Control. Los procedimientos control dieron resultados negativos en todos los casos, como era de esperar.

Los mejores resultados se obtuvieron, por tanto, mediante contacto con medio sólido y mediante aplicación con pincel. Se seleccionó como método de restauración la aplicación con pincel, en condiciones estériles, por sus mejores resultados en cuanto a la formación de capa de celulosa bacteriana y por su facilidad de implementación. Ya que la existencia de una cámara húmeda no implicaba ninguna mejora, se decidió no utilizarla. Del mismo modo la aplicación de medio de cultivo fresco a los tres días de comenzar el ensayo tampoco aportaba mejoras evidentes, por lo que también se descartó.

Con el método de aplicación seleccionado se ensayaron distintas concentraciones del inóculo en el medio de cultivo optimizado: $250\mu\text{L}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$; $5\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$; $15\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$; $25\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$; y $50\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$. La concentración que generaba una mayor cantidad de celulosa bacteriana tras 7 días de cultivo estático a 30°C fue la de $50\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$, por lo que fue esta la que se seleccionó para los ensayos sobre papeles modelo envejecidos y sin envejecer, y sobre los libros antiguos seleccionados. El método de purificación que se efectuó en este caso, fue un tratamiento térmico a 65°C durante 24 horas, como se concluyó en el capítulo 2 de Resultados y Discusión

Se efectuó, tras la restauración con pincel, un proceso de envejecimiento acelerado de todas las muestras para evaluar el efecto del paso del tiempo en las características del material restaurado. Por tanto, la caracterización de dichas muestras se efectuó antes y después de este proceso de envejecimiento. En todos los casos las muestras se acondicionaron antes de su caracterización. La generación de CB fue, para todos los ensayos, muy irregular y, aunque había zonas en las que el crecimiento era muy evidente y muy marcado, en otras por el contrario apenas se observó CB anclada a la celulosa vegetal. Este crecimiento irregular condujo a que los resultados obtenidos para las propiedades ensayadas fueran más dispersos que en los casos anteriores.

3.3.1.- Propiedades mecánicas

En la tabla 22 se muestran los datos del gramaje de las muestras originales, tras el proceso de crecimiento de la CB sobre ellas, y después de que este material reforzado haya sido envejecido. Podemos observar que el crecimiento de la capa de celulosa

bacteriana sobre las muestras nunca supone un aporte en peso superior a $2,0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, es decir, un incremento de peso muy pequeño. Recordemos que las capas de CB formadas en condiciones estáticas en el medio de cultivo optimizado sin etanol, y tras ser purificadas con un tratamiento térmico, alcanzaban gramajes de $12 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ (apartado 2.7 de Resultados y Discusión). Meftahi *et al.* (2010) obtuvieron un incremento cercano a $3,0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ tras seis días de cultivo de CB en gasas de algodón.

Pommet *et al.* (2008), utilizaron fibras de sisal y cáñamo como sustrato para células de *G. sucrofermentans* durante la fermentación, de manera que las nanofibrillas de CB que se generaban se iban depositando alrededor de dichas fibras naturales, alcanzando un aumento de peso del 2%, comparable a los aumentos obtenidos en esta tesis. Observaron en dicho estudio que, tras un lavado con NaOH, las nanofibras de CB permanecían ancladas a las fibras de sisal y cáñamo, mostrando la fuerza de la unión generada por el elevado número de enlaces por puentes de hidrógeno entre ambos tipos de fibras. Tras ser sometidas a un proceso de envejecimiento acelerado (tabla 22), las muestras reforzadas apenas muestran modificación en su gramaje.

Muestra	Sin reforzar	Reforzada con CB	Reforzada con CB y envejecida
F	$82,6 \pm 1,0$	$83,6 \pm 1,2$	$83,3 \pm 0,4$
F _E	$83,3 \pm 1,6$	$84,1 \pm 1,9$	$84,9 \pm 1,2$
M	$79,9 \pm 1,1$	$81,1 \pm 0,9$	$80,8 \pm 0,4$
M _E	$77,1 \pm 1,6$	$78,5 \pm 1,9$	$77,8 \pm 1,7$
Q	$80,4 \pm 1,5$	$82,2 \pm 0,8$	$81,3 \pm 0,6$
Q _E	$75,1 \pm 2,2$	$77,0 \pm 1,6$	$76,2 \pm 2,2$
L ₁	$93,2 \pm 1,9$	$93,2 \pm 2,6$	$92,9 \pm 1,5$
L ₂	$73,1 \pm 1,0$	$74,4 \pm 0,7$	$74,1 \pm 1,0$
L ₃	$52,2 \pm 0,5$	$53,6 \pm 0,4$	$53,0 \pm 0,6$

Tabla 22.- Gramaje ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) de las muestras originales y de las muestras reforzadas con CB, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (media \pm desviación estándar).

Los datos del espesor de las muestras originales, tras el proceso de crecimiento de la CB sobre ellas, y tras un proceso de envejecimiento acelerado una vez reforzadas, se muestran en la tabla 23. Se puede observar que el crecimiento de la capa de celulosa bacteriana sobre las muestras nunca supone un aporte en espesor superior a 10 μm . Las variaciones que se observan en los datos obtenidos pueden ser debidas, por un lado, al proceso de formación irregular de la capa de CB, y, por otro lado, al proceso de humectación del papel en el proceso de formación de la CB (esterilización en autoclave, aplicación del medio de cultivo, eliminación de la bacteria a 65°C, proceso de lavado...).

Muestra	Sin reforzar	Reforzada con CB	Reforzada con CB y envejecida
F	144,0 \pm 5,4	137,7 \pm 5,7	136,8 \pm 6,0
F_E	140,0 \pm 3,8	143,6 \pm 9,2	148,5 \pm 11,4
M	220,0 \pm 9,5	225,7 \pm 1,3	216,6 \pm 1,1
M_E	218,4 \pm 1,3	191,0 \pm 1,5	190,2 \pm 1,2
Q	121,5 \pm 3,2	125,7 \pm 3,6	121,6 \pm 2,6
Q_E	125,6 \pm 5,9	120,0 \pm 4,4	121,3 \pm 5,6
L₁	131,1 \pm 4,4	138,6 \pm 3,1	136,3 \pm 2,6
L₂	99,9 \pm 3,4	106,7 \pm 2,1	104,8 \pm 2,6
L₃	92,0 \pm 3,4	101,8 \pm 4,1	106,3 \pm 4,4

Tabla 23.- Espesor, medido en μm , de las muestras originales y de las muestras reforzadas con CB, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (media \pm desviación estándar).

Tanto la resistencia al estallido como la resistencia al desgarro (figura 59) aumentan muy ligeramente con el proceso de refuerzo con CB o, al menos, se mantienen en los valores originales sin causar ninguna pérdida. Algo similar concluyeron Pommet *et al.* (2008), que tras la fermentación de células de *G. sucrofermentans* sobre fibras

naturales de sisal y cáñamo, comprobaron que este tratamiento no afectaba a las propiedades mecánicas de dichas fibras naturales. Tras el envejecimiento tampoco se observa ninguna variación significativa en los valores de las resistencias estudiadas.

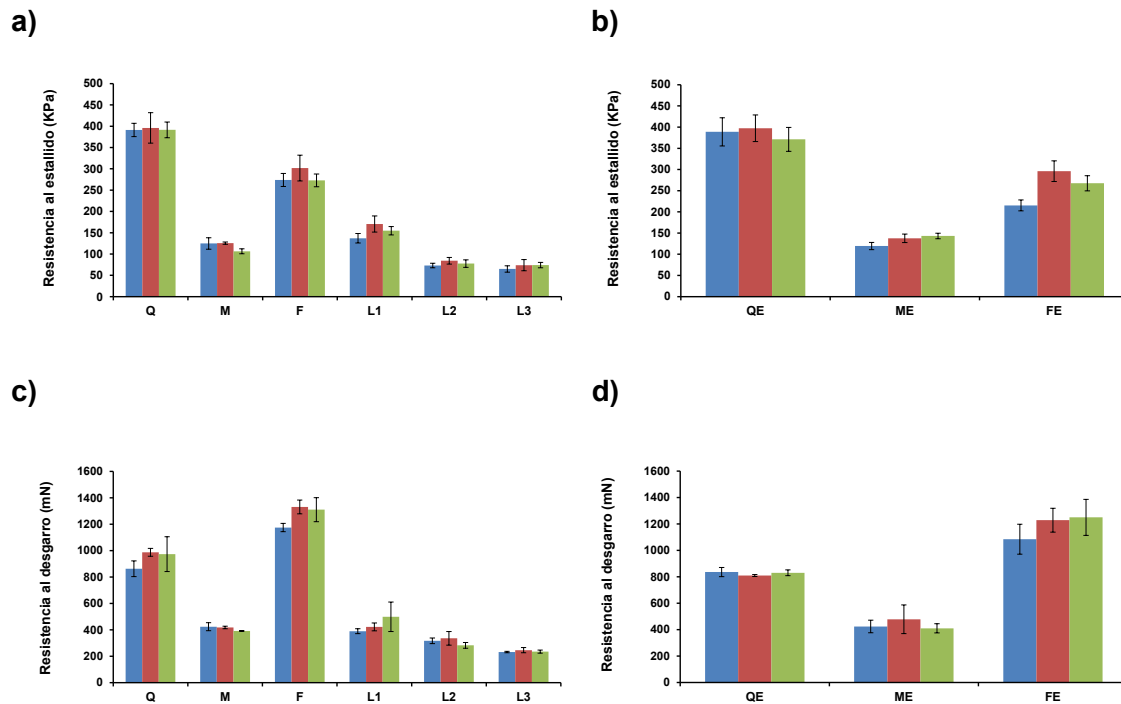


Figura 59.- a) Resistencia al estallido de las muestras sin envejecimiento previo, **b)** Resistencia al estallido de las muestras con envejecimiento previo, **c)** Resistencia al desgarr de las muestras sin envejecimiento previo, **d)** Resistencia al desgarr de las muestras con envejecimiento previo.

■ Muestras sin reforzar, ■ Muestras reforzadas sin envejecer, ■ Muestras reforzadas envejecidas.

Wu *et al.*, (2012), que hicieron crecer celulosa bacteriana sobre muestras de seda, obtuvieron que, tras 15 horas de cultivo, el aumento en la resistencia a tracción era muy marcado. Sin embargo, tras un proceso de envejecimiento, esta resistencia caía hasta alcanzar valores similares a los de la muestra original.

3.3.2.- Propiedades ópticas

Las coordenadas CIELab de los papeles modelo sin envejecimiento previo, los que han sido reforzados con celulosa bacteriana, y los que han sido envejecidos tras ese refuerzo, se pueden ver en la tabla 24. En todos los casos se puede observar que, tras el refuerzo con CB, la coordenada L* cae ligeramente, caída que vuelve a producirse tras el proceso de envejecimiento. La coordenada a* (rojo-verde) se mantiene en los tres casos en valores próximos a cero. En cuanto a la coordenada b* (azul-amarillo), no varía en la pasta mecánica y aumenta ligeramente en la pasta química y en el filtro con el refuerzo de la CB, ya que los valores originales eran muy bajos. Con el envejecimiento esta coordenada aumenta en los tres casos, como era de esperar.

		L*	a*	b*	ΔE^*
F	Sin reforzar	95,96 \pm 0,01	-0,91 \pm 0,02	3,94 \pm 0,02	-
	CB Sin envejecer	94,01 \pm 0,22	-0,62 \pm 0,03	5,64 \pm 0,16	2,60
	Envejecido	90,85 \pm 0,23	0,07 \pm 0,09	8,86 \pm 0,33	7,16
M	Sin reforzar	82,11 \pm 0,30	0,47 \pm 0,12	15,32 \pm 0,14	-
	CB Sin envejecer	79,45 \pm 0,56	0,51 \pm 0,22	14,70 \pm 0,29	2,73
	Envejecido	79,15 \pm 0,37	0,88 \pm 0,12	16,27 \pm 0,35	3,14
Q	Sin reforzar	94,30 \pm 0,17	-0,71 \pm 0,02	3,33 \pm 0,21	-
	CB Sin envejecer	91,96 \pm 0,36	-0,01 \pm 0,05	6,19 \pm 0,14	3,76
	Envejecido	90,85 \pm 0,20	0,06 \pm 0,04	8,41 \pm 0,42	6,19

Tabla 24.- Propiedades ópticas de las muestras originales y de las muestras reforzadas con CB, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (media \pm desviación estándar).

También en la tabla 24 figuran los resultados obtenidos para ΔE^* , la diferencia de color entre dos muestras, también llamado el error delta o el “delta e” (norma ISO 12647-2:2013). Es la diferencia de sensación que percibimos al visualizar dos colores. Hay varias maneras de calcularlo, la más común y sencilla viene definida por la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = ((L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2)^{1/2}$$

Cuando el valor de ΔE^* está por debajo de 3, la diferencia entre los colores no es apenas perceptible, mientras que datos superiores a 5 indican que la diferencia de color es evidente. Tanto los valores de ΔE^* de las muestras reforzadas con CB, como los de las muestras reforzadas y posteriormente envejecidas, se calcularon con respecto a su equivalente sin restaurar, es decir, el papel modelo que se refuerza. Como se puede observar, los valores de ΔE^* son muy bajos en todos los casos, es decir, el tratamiento con CB no afecta al color. Sólo tras el envejecimiento ese valor supera ligeramente los cinco puntos en el caso de las hojas de filtro y de pasta química. Este aumento es debido a que con el envejecimiento la coordenada colorimétrica b^* ha subido, hecho habitual en los procesos de envejecimiento del papel. Si esto no se observa en la pasta mecánica es porque el valor de partida de la coordenada b^* ya era alto. Wu *et al.*, (2012), que hicieron crecer celulosa bacteriana sobre muestras de seda, obtuvieron que, tras 15 horas de cultivo, el ΔE^* tampoco era significativo.

Cuando los papeles modelo han sido previamente envejecidos (tabla 25), el comportamiento en cuanto a las coordenadas CIELab es muy parecido al caso anterior. En todos los casos podemos observar que, tras el refuerzo con CB, la coordenada L^* cae ligeramente o se mantiene constante, tendencia que también se sigue tras el proceso de envejecimiento. La coordenada a^* (rojo-verde) se mantiene en los tres casos en valores muy pequeños. En cuanto a la coordenada b^* (azul-amarillo) se mantiene muy parecida al valor de las hojas envejecidas sin reforzar, si bien tras envejecer las muestras reforzadas esta coordenada aumenta ligeramente en los tres casos. En este caso cabe puntualizar que el valor de ΔE^* de los papeles modelo envejecidos, F_E , M_E y Q_E , se calculó en relación al color de sus equivalentes sin envejecer, F , M y Q . Los valores de ΔE^* de las muestras reforzadas y las muestras reforzadas y posteriormente envejecidas

se calcularon, al igual que en el caso anterior, con respecto al papel que es reforzado, esto es, F_E , M_E y Q_E . Se puede observar que, en todos los casos, las diferencias de color son inapreciables.

		L^*	a^*	b^*	ΔE^*
F_E	Sin reforzar	$93,35 \pm 0,04$	$-0,40 \pm 0,04$	$7,36 \pm 0,12$	4,33
	CB Sin envejecer	$92,60 \pm 0,19$	$-0,21 \pm 0,04$	$6,34 \pm 0,23$	1,28
	Envejecido	$91,14 \pm 0,35$	$0,05 \pm 0,08$	$8,14 \pm 0,19$	2,39
M_E	Sin reforzar	$81,37 \pm 0,26$	$0,99 \pm 0,08$	$16,74 \pm 0,19$	1,68
	CB Sin envejecer	$79,94 \pm 0,28$	$0,75 \pm 0,21$	$16,46 \pm 0,34$	1,48
	Envejecido	$78,79 \pm 0,20$	$1,28 \pm 0,14$	$17,16 \pm 0,46$	2,63
Q_E	Sin reforzar	$92,10 \pm 0,12$	$-0,30 \pm 0,03$	$7,12 \pm 0,28$	4,47
	CB Sin envejecer	$92,30 \pm 0,24$	$-0,46 \pm 0,07$	$6,04 \pm 0,32$	1,19
	Envejecido	$91,11 \pm 0,73$	$-0,01 \pm 0,18$	$7,76 \pm 0,37$	1,17

Tabla 25.- Propiedades ópticas de las muestras envejecidas y de las muestras envejecidas reforzadas con CB, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (media \pm desviación estándar).

En cuanto a las propiedades ópticas en el caso de los libros (tabla 26), tras el refuerzo con CB la coordenada L^* cae ligeramente o se mantiene constante. Tras el proceso de envejecimiento de las muestras reforzadas no se observa ninguna variación en esta coordenada. La coordenada a^* (rojo-verde) se mantiene en los tres casos también constante. Si se observan los datos referentes a la coordenada b^* (azul-amarillo), se comprueba que, si bien el comportamiento es irregular, los cambios no son en ningún caso significativos.

Las diferencias de color de los libros reforzados, y de los libros reforzados y posteriormente envejecidos, se calcularon con respecto al papel que se refuerza, L_1 , L_2 , L_3 (tabla 26). Estas diferencias vienen dadas, como ya se ha explicado, por los valores de ΔE^* . En este caso puede haber una ligera diferencia de color en el caso de L_3 y de L_2 reforzados sin envejecer, pero en cualquier caso muy sutil y apenas perceptible.

		L^*	a^*	b^*	ΔE^*
L_1	Sin reforzar	$86,35 \pm 0,25$	$-0,32 \pm 0,13$	$14,43 \pm 0,38$	-
	CB Sin envejecer	$85,01 \pm 0,45$	$0,20 \pm 0,15$	$11,47 \pm 0,41$	3,29
	CB Envejecido	$85,21 \pm 0,68$	$0,36 \pm 0,16$	$12,18 \pm 0,33$	2,61
L_2	Sin reforzar	$84,73 \pm 0,66$	$-0,07 \pm 0,15$	$15,85 \pm 1,58$	-
	CB Sin envejecer	$79,78 \pm 1,08$	$0,93 \pm 0,33$	$17,20 \pm 1,22$	5,23
	CB Envejecido	$80,59 \pm 0,64$	$0,93 \pm 0,21$	$16,00 \pm 0,54$	4,26
L_3	Sin reforzar	$79,72 \pm 1,49$	$2,42 \pm 1,57$	$22,86 \pm 3,26$	-
	CB Sin envejecer	$74,74 \pm 1,70$	$1,97 \pm 0,93$	$19,90 \pm 1,97$	5,81
	CB Envejecido	$74,77 \pm 2,66$	$2,48 \pm 0,79$	$20,25 \pm 1,23$	5,60

Tabla 26.- Propiedades ópticas de los libros y de los libros reforzados con CB, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (media \pm desviación estándar).

Los datos de opacidad se muestran en la tabla 27. Como se puede ver, la opacidad de las muestras sin reforzar es algo más elevada cuando el material ha sido previamente envejecido. Tras el refuerzo con celulosa bacteriana la opacidad aumenta o se mantiene, pero en todos los casos la modificación es muy pequeña. En cuanto al efecto del envejecimiento, aunque leve, se puede observar una ligera tendencia a

aumentar en los valores más pequeños, mientras que para opacidades superiores al 95% el valor se mantiene prácticamente invariable. Esta misma tendencia se observaba también cuando el método de restauración consistía en generar la capa de CB y pegarla al material a restaurar mediante almidón de trigo.

Muestra	Sin reforzar	Reforzada con CB	Reforzada con CB y envejecida
F	80,44 ± 0,65	84,52 ± 1,29	88,38 ± 3,18
F_E	85,97 ± 0,68	85,96 ± 1,90	88,28 ± 1,75
M	96,87 ± 0,37	97,90 ± 2,23	97,71 ± 2,01
M_E	97,55 ± 0,36	97,92 ± 0,65	97,89 ± 0,92
Q	71,12 ± 1,04	75,04 ± 1,26	76,79 ± 1,20
Q_E	74,00 ± 1,51	73,79 ± 1,42	76,58 ± 2,86
L₁	97,81 ± 1,00	97,26 ± 1,66	96,54 ± 1,61
L₂	98,40 ± 0,81	96,85 ± 3,06	98,77 ± 0,40
L₃	89,73 ± 4,24	94,45 ± 2,99	95,52 ± 2,56

Tabla 27.- Opacidad (%) de las muestras originales, reforzadas con CB, antes y después de un proceso de envejecimiento acelerado (media ± desviación estándar).

Los valores del brillo especular pueden observarse en la tabla 28. Se puede comprobar que los valores de las muestras originales son bajos en todos los casos. Tras el refuerzo con la celulosa bacteriana se produce un aumento que, en el caso de los libros, nunca supera los 6 puntos. El mayor aumento de brillo tiene lugar en el caso de la pasta mecánica envejecida, de cerca de 16 puntos. Recordemos que con el método de restauración anterior el brillo aumentaba en más de 10 puntos para los libros, mientras

que para los papeles modelo el aumento llegaba hasta los 15 puntos. Al igual que lo concluido en el método anterior, podemos decir que si los papeles a restaurar son mate, como en este caso, el aumento de brillo al restaurar es apreciable. Sin embargo, si los papeles a restaurar tuvieran valores mayores de brillo especular la generación de celulosa bacteriana no provocaría cambios en este sentido.

Con el envejecimiento no se observan cambios de brillo significativos, al igual que en el método de restauración anterior.

Muestra	Sin reforzar	Reforzada con CB	Reforzada con CB y envejecida
F	5,17 ± 0,11	14,48 ± 1,05	19,57 ± 1,60
F_E	5,13 ± 0,11	21,19 ± 1,77	20,39 ± 1,92
M	6,05 ± 0,22	7,39 ± 0,38	7,81 ± 0,40
M_E	8,53 ± 0,56	24,00 ± 1,44	19,02 ± 2,03
Q	6,57 ± 0,26	19,32 ± 1,59	21,63 ± 0,96
Q_E	5,44 ± 0,60	17,64 ± 1,75	16,85 ± 1,89
L₁	4,58 ± 0,34	10,89 ± 1,54	12,45 ± 1,01
L₂	4,68 ± 0,34	7,11 ± 0,87	6,55 ± 0,98
L₃	8,97 ± 0,58	14,23 ± 1,63	9,75 ± 1,15

Tabla 28.- Brillo especular (%) de las muestras originales, reforzadas con CB sin envejecer y envejecidas (media ± desviación estándar).

3.3.3.- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se tomaron imágenes de la superficie de las hojas laminadas y de su corte lateral. En ningún caso se apreciaron diferencias significativas, ni con el tipo de material a restaurar ni con el proceso de envejecimiento, por lo que tanto en la figura 60 como en la 61, se muestran únicamente imágenes SEM de una pasta mecánica reforzada. Se buscaron, para ello, las zonas donde había mayor crecimiento de celulosa bacteriana. En la imagen 60a se pueden observar las irregularidades comentadas, incluso se ven huecos en la lámina generada. En la imagen 60b puede comprobarse que la estructura en capas de la CB, de la que se ha hablado en repetidas ocasiones, también tiene lugar en el caso de que el refuerzo se efectúe mediante su generación *in situ*. Debido a la existencia de abundantes grupos hidroxilo y a la elevada cristalinidad de la CB, se formaron buenas interacciones entre ésta y la celulosa del papel.

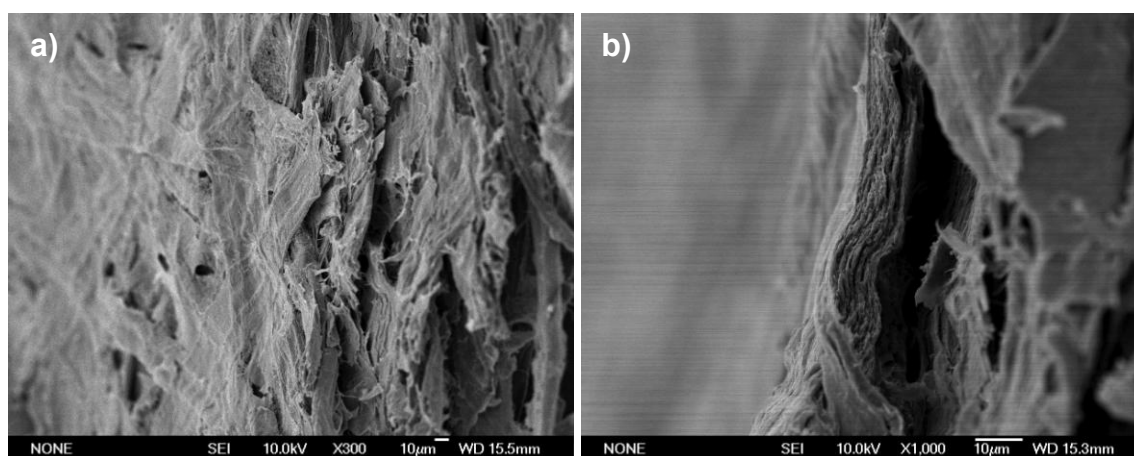


Figura 60.- Imágenes SEM de una hoja de pasta mecánica reforzada con celulosa bacteriana.

a) Imagen de la superficie a 300x, **b)** Imagen lateral a 1000x.

La figura 61 muestra el crecimiento en superficie de la celulosa bacteriana. En la imagen 61a pueden observarse las fibras vegetales que han sido cubiertas con la celulosa bacteriana. En la imagen 61b queda patente que la zona donde ha crecido la celulosa bacteriana hasta formar una capa (izquierda de la imagen), tiene una superficie

más lisa. La irregularidad en el crecimiento de la capa de CB puede observarse en la imagen 61c. En la figura 61d la estructura en capas de la celulosa bacteriana que ha crecido en el papel reforzado también puede verse en superficie.

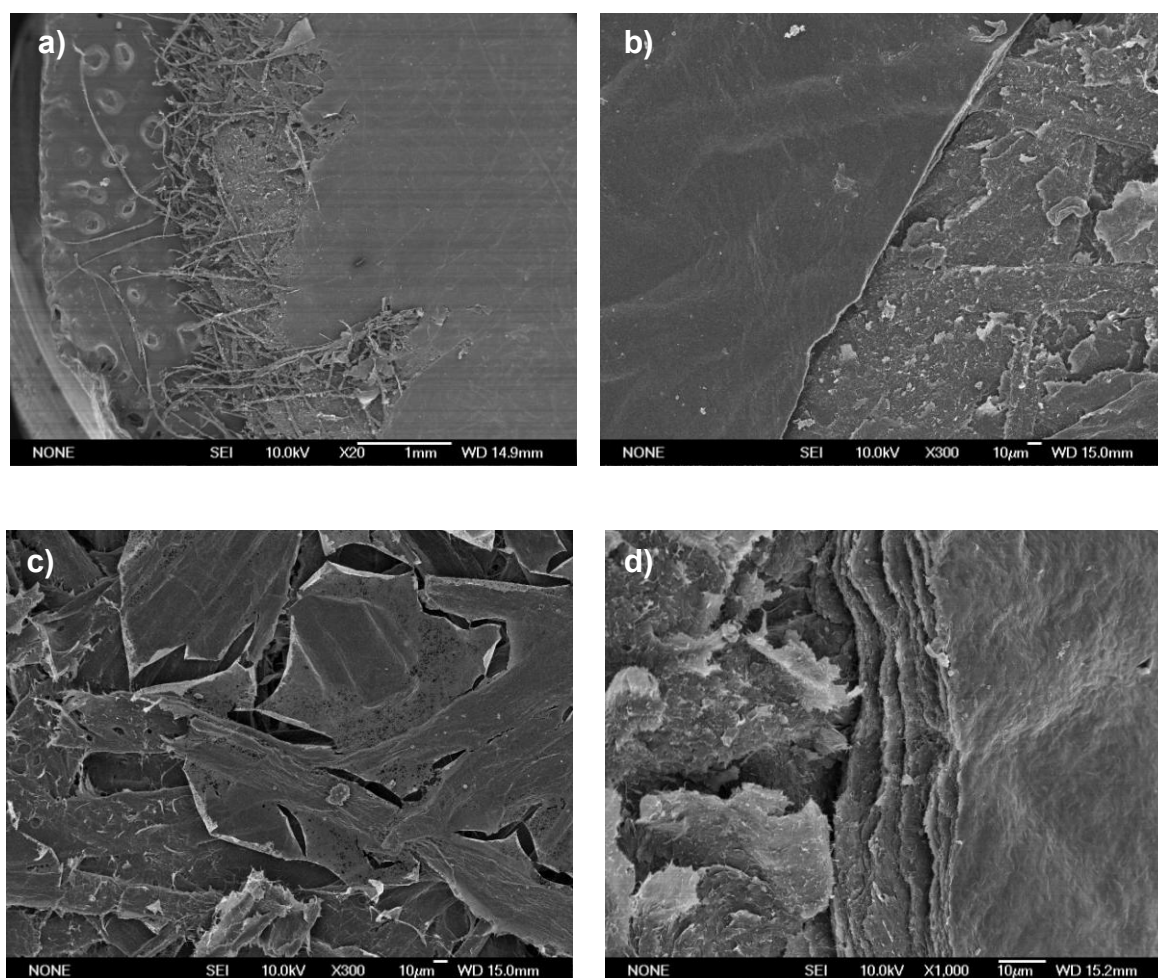


Figura 61.- Imágenes SEM de la superficie de una hoja de pasta mecánica reforzada con celulosa bacteriana. **a)** 20x, **b)** 300x, **c)** 300x, **d)** 1.000x.

3.3.4.- Porosidad Gurley

La permeabilidad al aire se ha determinado como porosidad Gurley. Aunque la irregularidad en el crecimiento de la celulosa bacteriana sobre los materiales a restaurar

ha quedado patente en todas las propiedades, es, sin duda, en la permeabilidad al aire donde más se manifiesta esta heterogeneidad. Por ello, la tabla 29 presenta valores medios de permeabilidad sólo en el caso de las muestras sin reforzar, mientras que cuando ya se ha efectuado el refuerzo con celulosa bacteriana, lo que figura es un intervalo de valores, desde el más pequeño en las zonas donde el crecimiento de la celulosa fue más leve, hasta las zonas donde la celulosa bacteriana había crecido mucho. En estas últimas zonas donde el crecimiento ha sido más intenso, los valores de permeabilidad al aire llegan incluso a multiplicar por 40 el valor original (L_2).

Muestra	Sin reforzar	Reforzada con CB	Reforzada con CB y envejecida
F	$7,48 \pm 0,84$	45 - 282	93 - 290
F_E	$3,38 \pm 0,36$	100 - 238	82 - 141
M	$31,87 \pm 2,82$	56 - 133	67 - 78
M_E	$61,10 \pm 3,06$	204 - 375	167 - 301
Q	$12,17 \pm 0,85$	170 - 1200	260 - 560
Q_E	$41,30 \pm 2,87$	320 - 1170	245 - 465
L₁	$25,8 \pm 1,84$	96 - 214	60 - 264
L₂	$42,21 \pm 2,01$	147 - 1735	66 - 248
L₃	$21,89 \pm 1,86$	65 - 290	66 - 152

Tabla 29.- Permeabilidad al aire Gurley, medida en segundos, de las muestras originales, reforzadas con CB sin envejecer y envejecidas (media \pm desviación estándar).

En el caso de la pasta mecánica la estructura es más abierta ya que es más porosa, por eso cabe pensar que la celulosa bacteriana se ha introducido en estos poros y no ha llegado a cerrar del todo dicha estructura, con lo que el aumento que se produce es menor que en el resto de los papeles modelo. En el caso de la pasta química se forma

una capa especialmente cerrada o más superficial que en el resto, probablemente porque al encontrarse más libre de otros elementos como lignina o hemicelulosas, la unión con la CB ha sido más íntima.

Yousefi *et al.*, (2013), concluyeron que la CB forma una estructura completamente cerrada, no permeable al aire, propiedad atribuible a su nanoestructura de multicapas altamente compacta (Fendler *et al.*, 2007). Este hecho puede también ser comprobado en los elevados valores de resistencia al paso del aire de nuestro ensayo.

3.3.5.- Ángulos de contacto estáticos y dinámicos

La mojabilidad ha sido estudiada mediante los ángulos de contacto estáticos y dinámicos. Los ángulos de contacto estáticos se pueden ver en la tabla 30.

Muestra	Sin reforzar	Reforzada con CB	Reforzada con CB y envejecida
F	23,1 ± 2,2	38,6 ± 4,3	57,0 ± 5,4
F _E	32,6 ± 3,9	55,2 ± 4,9	58,8 ± 6,1
M	60,4 ± 6,8	62,2 ± 6,7	68,7 ± 4,9
M _E	66,9 ± 6,3	56,7 ± 5,9	65,2 ± 5,7
Q	52,0 ± 5,2	43,2 ± 4,2	60,5 ± 6,3
Q _E	61,5 ± 5,9	56,4 ± 4,3	52,1 ± 5,9
L ₁	122,6 ± 4,1	63,9 ± 5,3	79,3 ± 4,4
L ₂	121,4 ± 2,4	61,3 ± 5,8	59,7 ± 6,0
L ₃	118,6 ± 3,7	81,9 ± 8,1	72,7 ± 6,3

Tabla 30.- Ángulos de contacto estáticos (°) de las muestras originales, reforzadas con CB sin envejecer y envejecidas (media ± desviación estándar).

Recordemos que con el método de laminación con celulosa bacteriana se alcanzaban ángulos entre 65° y 90°, es decir, tendían a ser iguales independientemente del papel a restaurar. En el caso de la generación de CB *in situ*, la tendencia es también a uniformizar. Sin embargo, la irregularidad en el crecimiento de la capa hace que el rango obtenido sea más amplio. Así, mientras que en las muestras originales sin reforzar los ángulos de contacto varían desde los 23° del filtro a los 123° del libro 1, cuando se efectúa el refuerzo con CB el rango disminuye desde 38,61° hasta 82°. Según Gao *et al.*, (2011), debido a la elevada cristalinidad de la CB su estructura es muy densa, provocando que cualquier tratamiento que haya sido efectuado a los libros, como por ejemplo el encolado, quede “tapado”.

La mojabilidad dinámica de las muestras se estudió examinando el cambio de los ángulos de contacto con el tiempo. Para ello, y debido nuevamente a la irregularidad de los datos obtenidos, se escogieron los resultados de las zonas donde la celulosa bacteriana había crecido más uniformemente (figuras 62 y 63). Los valores de α se normalizaron en relación con los valores iniciales correspondientes a 0 segundos.

En la figura 62 se muestran las curvas de mojabilidad dinámica correspondientes a los papeles modelo. Como ya se vió en el capítulo anterior y ahora se confirma, cada papel modelo tiene una mojabilidad dinámica diferente. Cuando la celulosa bacteriana crece sobre ellos la curva de mojabilidad adquiere una pendiente menor en todos los casos, es decir, hace que la hidrofobicidad aumente, confirmando la tendencia descrita anteriormente de uniformizar los papeles que refuerza. Con el envejecimiento la curva es incluso más tumbada, aumentando aún más la hidrofobicidad de las muestras tratadas. Este efecto provocado por el envejecimiento ya se comprobó en las capas de celulosa bacteriana (capítulo 2 de Resultados y Discusión).

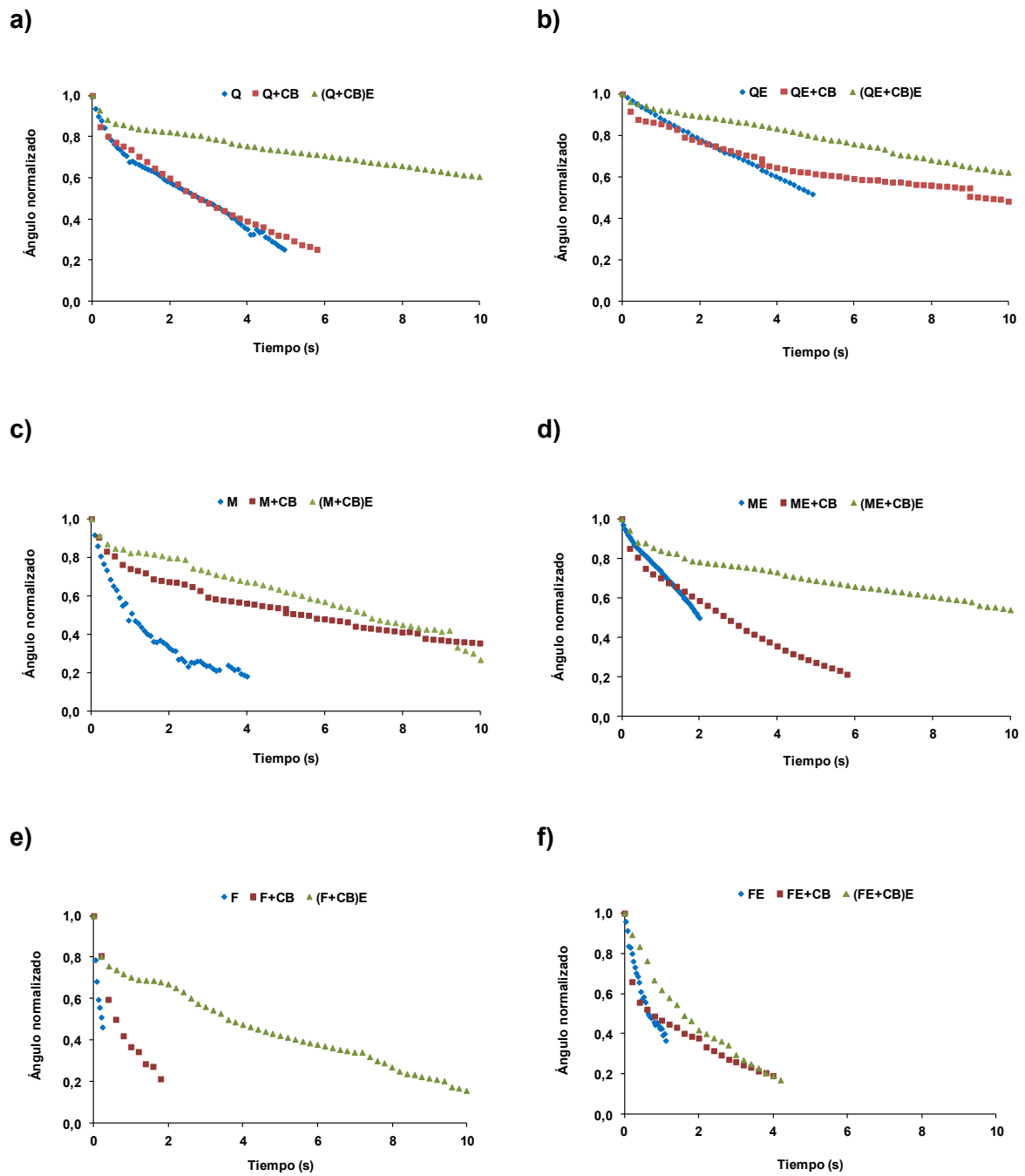


Figura 62.- Ángulos de contacto dinámico de los papeles modelo sin reforzar, reforzados, y reforzados y envejecidos, **a)** Pasta química, **b)** Pasta química envejecida, **c)** Pasta mecánica, **d)** Pasta mecánica envejecida, **e)** Filtro, **f)** Filtro envejecido.

Los ángulos de contacto dinámicos normalizados de los libros se muestran en la figura 63.

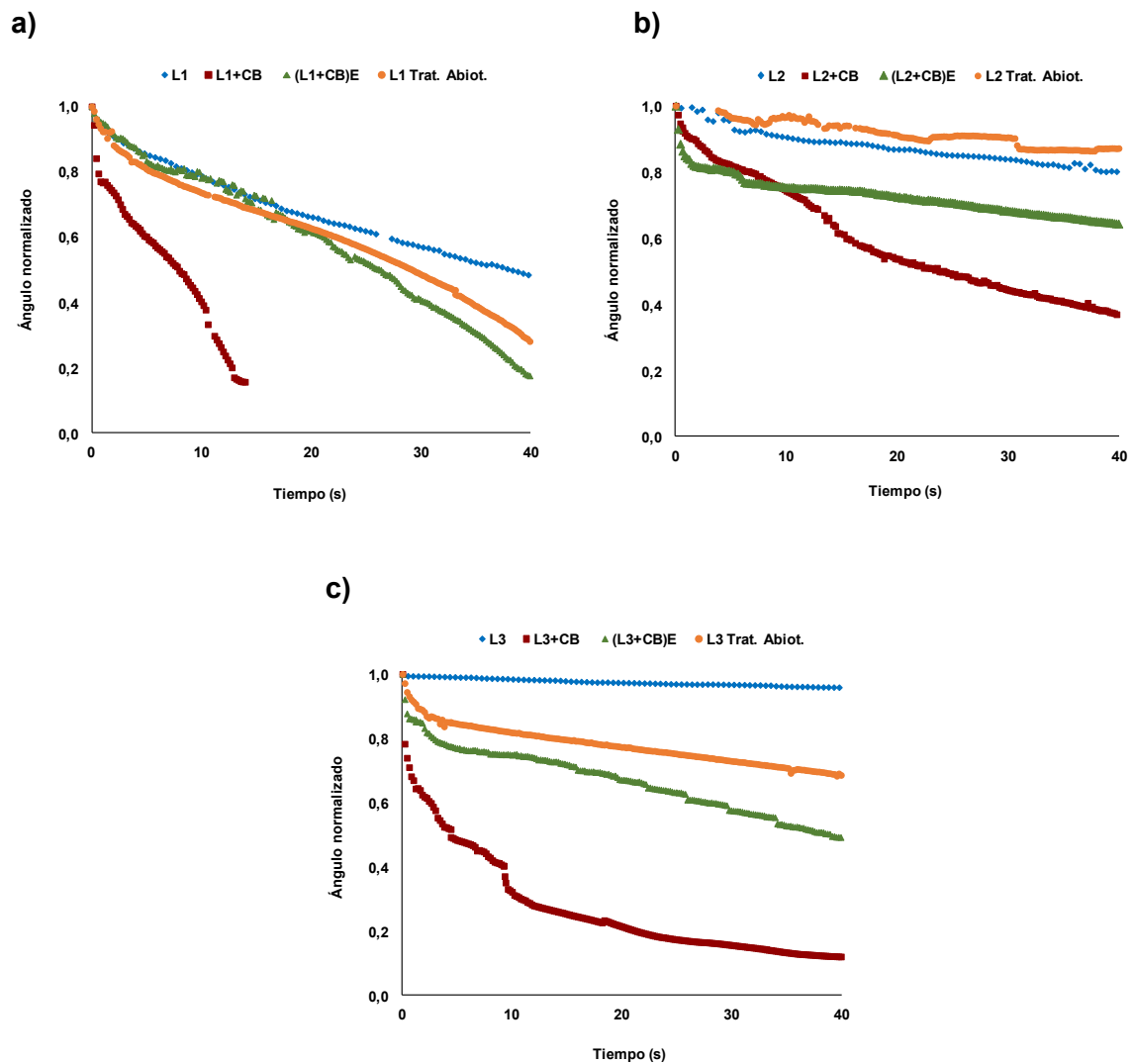


Figura 63.- Ángulos de contacto dinámicos de los libros antes y después del refuerzo, después de ser reforzados y envejecidos, y tras ser sometidos a un tratamiento abiótico.

a) Libro 1, b) Libro 2, c) Libro 3.

Se comprobó que, tras el crecimiento de la celulosa bacteriana sobre los tres libros, la pendiente de la curva de mojabilidad aumentaba muy bruscamente, hecho que parecía entrar en contradicción con el carácter hidrófobo de la celulosa bacteriana. Se

efectuó entonces un ensayo adicional con el objetivo de evaluar el efecto del protocolo de refuerzo sobre la mojabilidad dinámica de los libros. Para ello se les sometió al mismo proceso de generación de CB, pero sin añadir inóculo al medio de cultivo. Este procedimiento se denominó tratamiento abiótico. Se comprobó, como puede verse en la figura 63, que el efecto de este proceso era muy leve, algo más evidente en el caso de L_3 que, como vemos por su ángulo de contacto, está muy encolado. Por tanto, el aumento de la pendiente de la curva al efectuar el crecimiento de la celulosa bacteriana, no puede ser achacado al método de restauración, si no, probablemente, al hecho de que la bacteria esté utilizando el agente de encolado de estos libros como fuente de alimento. En un ensayo cualitativo efectuado sobre los libros se comprobó que este encolado no había sido hecho con almidón. Dada la fecha de edición de los libros es muy probable que el encolado se efectuara con algún tipo de gelatina animal, lo cual sería consistente con el posible uso de este agente de encolado como nutriente por parte de la bacteria.

3.3.6.- Conclusiones

Se puede concluir que cuando el inóculo de *G. sucrofermentans* CECT7291 se aplica a un papel con un pincel junto con el medio de cultivo seleccionado, la celulosa que va excretando se une a las fibras de la celulosa de dicho papel.

Las propiedades del material que se restaura no se ven afectadas en un grado significativo por el refuerzo aplicado, salvo en el caso de la permeabilidad al aire. Esta propiedad, muy importante en la conservación de documentos históricos, desciende notablemente con el crecimiento de la CB sobre el papel. Esta conclusión concuerda con la enunciada por Wu *et al.*, (2012), que encontraron que la CB es un material prometedor para la restauración de tejidos de seda y otras aplicaciones de refuerzo.

A la vista de los resultados obtenidos se puede abrir otro campo de estudio en la aplicación de celulosa bacteriana, el del envasado de alimentos, tal y como concluyeron Vijayendra *et al.*, (2014), ya que la baja permeabilidad al aire también es una propiedad fundamental para este uso. Del mismo modo Khan *et al.*, (2014) estudiaron el uso de nanocelulosa para las industrias de envasado de alimentos, en las que actualmente casi todos los polímeros biodegradables se producen a partir de productos petroquímicos.

Debido a la preocupación por el medio ambiente y la creciente dificultad en el manejo de los residuos sólidos, los materiales poliméricos biodegradables y bio-nanocompuestos pueden estar entre las alternativas más adecuadas para muchas aplicaciones. La celulosa bacteriana es uno de estos materiales.

V.- CONCLUSIONES

Esta tesis doctoral estudia las características de la celulosa generada por la bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291, y su posible uso como material de refuerzo para la restauración y conservación de documentos. Se desarrollan también, en esta tesis, dos protocolos de restauración con dicha celulosa, laminación y generación *in situ*, evaluando la estabilidad en el tiempo de los materiales reforzados con ambos métodos.

De los resultados anteriormente descritos se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- El medio de cultivo que proporciona un buen balance entre la tasa de producción de celulosa bacteriana y el consumo de fuente de carbono, dando lugar a capas de CB homogéneas y resistentes, tiene fructosa como fuente de carbono, y extractos de levadura y maíz como fuentes de nitrógeno.
- La adición de un 1% de etanol al medio de cultivo mejora la producción de celulosa bacteriana, pero reduce significativamente el pH. Esta disminución de pH es una gran desventaja cuando la celulosa se genera *in situ* sobre el papel a restaurar, ya que podría causar hidrólisis ácida del papel que se restaura. Sin embargo, esta limitación no existe si las capas de CB se generan independientemente y se aplican sobre el papel con la ayuda de un adhesivo tras una etapa de purificación.
- Para los dos protocolos de restauración desarrollados, los medios de cultivo y los métodos de purificación más adecuados son los siguientes:
 - a) Para la *producción de láminas de celulosa bacteriana y su aplicación posterior al material a restaurar (laminación)*: medio de cultivo HS modificado con fructosa, extracto de levadura, extracto de maíz y un 1% de etanol. El método de purificación elegido es un tratamiento alcalino (1 hora a 90 °C en NaOH al 1%), que produce un incremento en la viscosidad, cristalinidad y pureza, y elimina las células bacterianas.
 - b) Para la *generación in situ de la celulosa bacteriana sobre el papel a restaurar*: medio de cultivo HS modificado con fructosa, extracto de levadura y extracto de maíz. El método de purificación elegido es un tratamiento térmico (24 horas a

65°C), menos agresivo que el alcalino y que proporciona capas de CB de calidad similar a las no tratadas, con una ligera purificación que conlleva una leve mejora del grado de polimerización y de las propiedades mecánicas.

- La celulosa bacteriana presenta, en ambos casos, un alto índice de cristalinidad, baja porosidad interna, elevada resistencia al estallido, aceptable resistencia al desgarrar y buenas propiedades ópticas. Un proceso de envejecimiento acelerado causa en las capas de CB un aumento de la cristalinidad y una disminución del volumen de poro, manteniendo prácticamente el mismo índice de desgarrar y un índice de estallido menor, que, sin embargo, permanece superior al de la celulosa vegetal. En general, las propiedades de la CB obtenida son estables en el tiempo.
- Comparando la celulosa bacteriana con el papel japonés, material ampliamente utilizado en laminación, se comprueba que aquélla tiene un menor espesor con un gramaje similar. Además, las capas de CB tienen mayor índice de estallido y menor opacidad. Por el contrario, el PJ tiene mayor resistencia al desgarrar. Ambos materiales tienen coordenadas colorimétricas similares. Debido a la diferencia de brillo especular de estos dos materiales, cada uno podría ser utilizado para restaurar distintos tipos de documentos, de manera que la CB sería muy adecuada para restaurar documentos en papel vegetal, estucado, pergamino y vitela. Además, la CB produce una leve tendencia al amarilleamiento. Esto puede ser considerado una ventaja si el papel a restaurar posee, como es común en papeles antiguos, un amarilleamiento elevado. La diferencia más destacable es la permeabilidad al aire: mientras que la CB no deja pasar flujo de aire a su través, el PJ apenas muestra resistencia a dicho paso de aire.
- El almidón de trigo es el adhesivo seleccionado para laminar. Las propiedades mecánicas de las muestras mejoran tras el laminado, ya que los índices de desgarrar y estallido aumentan o, al menos, siguen siendo similares al valor original incluso después de un proceso de envejecimiento acelerado. Aunque el laminado con PJ modifica las propiedades ópticas originales en menor medida que si se realiza con CB, la legibilidad de los textos es mucho mejor en este último caso. Esta característica es muy importante cuando los documentos a restaurar tienen un alto valor histórico. En las muestras laminadas la mojabilidad disminuye, efecto que cuando se lamina con CB es independiente del material a restaurar. El descenso en la mojabilidad causado por

la CB está relacionado con la reducción en la permeabilidad al aire. Cuando los papeles laminados se someten a un proceso de envejecimiento acelerado, no hay importantes cambios en ninguna característica en relación a las muestras laminadas no envejecidas, excepto en un aumento del amarilleamiento. También se puede concluir que el envejecimiento acelerado disminuye la tasa de mojado en todas las muestras laminadas.

- Para la generación de celulosa bacteriana *in situ* sobre el papel a restaurar, el método de aplicación más adecuado es mediante pincel. No aparecen modificaciones apreciables en ninguna característica, salvo en la permeabilidad al aire, que disminuye de manera muy evidente con la generación de la CB. Se obtiene un material con una estructura muy cerrada, que, en algunos de los casos ensayados, es prácticamente impermeable al aire. Por tanto, independientemente del papel a restaurar, la CB proporciona una protección adecuada frente a los contaminantes atmosféricos, importantes agentes causantes de la degradación del papel.
- Como conclusión general de este trabajo de investigación, se puede establecer que la celulosa bacteriana generada por *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT7291 es un material muy prometedor en el campo de la restauración, ya que proporciona un refuerzo de características muy adecuadas y muy estables en el tiempo.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, Y., Cadel, F., Voillot, C. (1988). Constituants fibreux des pâtes, papiers et cartons. Pratique de l'analyse. Centre Technique de l'Industrie des Papiers, Cartons et Celluloses. Grenoble. France. ISBN: 2.906579.01.7.
- Ammon, H.P., Ege, W., Oppermann, M., Göpel, W., Ejsele, S. (1995). Improvement in the long-term stability of an amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin. *Analytical Chemistry* 67:466-471.
- Andersson, C., Jonhed, A., Järnström, L. (2008). Composition and film properties of temperature responsive, hydrophobically modified potato starch. *Starch* 60:539-550.
- Ardelean, E., Bobu, E., Niculescu, G.H., Groza, C. (2011). Effects of different consolidation additives on ageing behavior of archived document paper. *Cellulose Chemistry and Technology* 45:97-103.
- Area, C., Cheradame, H. (2011). Paper aging and degradation: recent findings and research methods. *BioResources* 6:5307-5337.
- Asenjo, J.L., Hidalgo, C. El papel: 2000 años de historia. Exposición itinerante de la Asociación Hispánica de Historiadores del Papel.
http://www.aspapel.es/sites/default/files/adjuntos/Doc%20141_0.pdf.
- Astley, O.M., Chaliaud, E., Donald, A.M., Gidley, M.J. (2003). Tensile deformation of bacterial cellulose composites. *International Journal of Biological Macromolecules* 32:28-35.
- Bansa, H., Ishii, R. (1997). The effect of different strengthening methods on different kinds of paper. *Restaurator* 18:51-72.
- Baranov, A.I., Anisimova, V.N., Khripunov, A.K., Baklagina, Y.G. (2003). Dielectric properties and dipole glass transition in cellulose *Acetobacter xylinum*. *Ferroelectrics* 289:141-151.
- Barrow, W. (1959). Deterioration of book stock: Causes and remedies; two studies on the permanence of book paper. Virginia State Library. Richmond (USA).

- Barud, H.S., Assuncao, M.N., Martines, M.A.U., Dexpert-Ghys, J., Marques, R.F.C., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J.L. (2008). Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 46:363-367.
- Basta, A.H., El-Saied, H. (2009). Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *Journal of Applied Microbiology* 107:2098-2107.
- Baty, J.W., Maitland, C.L., Minter, W., Hubbe, M.A., Jordan-Mowery, S.K. (2010). Deacidification for the conservation and preservation of paper-based works: a review. *BioResources* 5:1955-2033.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2002). Bacterial cellulose. En: *Biopolymers. Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes* (Steinbuchel, A., ed.) Wiley-VCH. Munster (Germany). Pp:37-90.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2005). Bacterial cellulose. En: *Biotechnology of polymer: From synthesis to patents* (Steinbuchel, A., ed.). Wiley-VCH. Weinheim (Germany). Pp:381-434.
- Borzani, W., Souza, S.J. (1995). Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnology Letters* 17:1271-1272.
- Brackmann, C., Bodin, A., Åkeson, M., Gatenholm, P., Enejder, A. (2010). Visualization of the cellulose biosynthesis and cell integration into cellulose scaffolds. *Biomacromolecules* 11:542-548.
- Brett, C. T. (2000). Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition and integration into the cell wall. *International Review of Cytology* 199:161-199.
- Brindley, C., Corson, S., Juvonen, K., Wakelin, R. (1997). Effects of long fiber enhancement on radiata pine toplog newsprint. *Appita Journal* 50: 381-386.
- Brown, R.M. Jr. (1996). The biosynthesis of cellulose. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* A33:1345-1373.

- Brown, R.M.Jr., Saxena, I.M., Krystyna Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science* 1:149–156.
- Cai, Z., Jin, H., Kim, J. (2009). Chitosan blended bacterial cellulose as a smart material for biomedical application. En: *Proceedings of SPIE 7291, Nanosensors, biosensors and info-tech sensors and systems* (Varadan, V.K. ed.).
- Caicedo, L. (2002). A Produção de Celulose Bacteriana em Reatores de Tambor Rotatório. Tesis doctoral. Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).
- Caicedo, L., De França, F., Lopez, L. (2001). Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática. *Revista Colombiana de Química* 30:155-162.
- Chao, Y., Miratai, M., Sugano, Y., Shoda, M. (2001). Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50- L Airlift Reactor. *Biotechnology Progress* 17:781-785.
- Chávez-Pacheco, J.L., Martínez-Yee, S., Contreras-Zentella, M., Escamilla-Marván, E. (2004). Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 7:18-25.
- Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A., Singhal, R.S. (2009). Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technolgy and Biotechnology* 47:107-124.
- Chen, W., Zhong, L-X., Peng, X-W., Wang, K., Chena, Z.F., Sun, R-C. (2014). Xylan-type hemicellulose supported palladium nanoparticles: a highly efficient and reusable catalyst for the carbon-carbon coupling reactions. *Catalysis Science & Technology* 4:1426-1435.
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M., Demirci, A. (2009). Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material properties. *Cellulose* 16:1033-1045.
- Chibowski, E. (2003). Surface energy of solid from contact angle hysteresis. *Advances in Colloid and Interface Science* 103:149-172.

- Chinga-Carrasco, G., Axelsson, M., Eriksen, O., Svensson, S. (2008a). Structural characteristics of pore networks affecting print-through. *Journal of Pulp and Paper Science* 34:13-22.
- Chinga-Carrasco, G., Gregersen, Ø., Dougherty, R. (2003). Paper surface characterization by laser profilometry and image analysis. *Journal of Microscopy and Analysis* 84:5-7.
- Chinga-Carrasco, G., Kauko, H., Myllis, M., Timonen, J., Wang, B., Zhou, M., Fossum, J.O. (2008b). New advances in the 3D characterization of mineral coating layers on paper. *Journal of Microscopy* 232:212-224.
- Ciechanska, D., Struszczyk, H., Kazimierczak, J., Guzinska, K., Pawlak, M., Kozłowska, E., Matusiak, G., Dutkiewicz, M. (2002). New electro-acoustic transducers based on modified bacterial cellulose. *Fibres and Textiles in Eastern Europe* 10:27-30.
- Cleenwerck, I., De Vos, P., De Vuyst, L. (2010). Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans* as *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Toyosaki *et al.* 1996) sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2277-2283.
- Çoban, E.P., Biyik, H. (2011). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. *African Journal of Biotechnology* 10:5346-5354.
- Colvin, J.R. (1957). Formation of cellulose microfibrils in a homogenate of *Acetobacter xylinum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 70:294-295.
- Colvin, J.R., Leppard, G.G. (1977). The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*. *Canadian Journal of Microbiology* 23:701-709.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Crespo, C., Viñas, V. (1984). La preservación y restauración de documentos y libros en papel: un estudio del RAMP con directrices. UNESCO. Paris (Francia).

- Czaja, W., Romanovicz, D., Brown, R.M.Jr. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* 11:403-411.
- Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M., Brown, R.M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 8:1-12.
- De Lera A., Escohotado T., Blum L.J., Marquette, C.A. (2009). Método experimental para consolidar fibras de papel (I Parte del Estudio). *Ge-conservación* 0:177-188.
- De Ory, I., Romero, E.L., Cantero, D.E. (1998). Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter acetii* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:189-193.
- De Ory, I., Romero, E.L., Cantero, D.E. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acidifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering* 63:39-45.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., Mukherjee, A. (2014). Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Frontiers in Microbiology* 5:304.
- Djerbi, S. (2005). Cellulose synthases in *Populus*. Identification, expression analyses and in vitro synthesis. Tesis doctoral School of Biotechnology, AlbaNova University Center, Royal Institute of Technology, Stockholm (Sweden). ISBN 91-71-78-109-9.
- Duvey, V., Pandey, L., Saxena, C. (2005). Pervaporative separation of ethanol/water azeotrope using a novel chitosan-impregnated bacterial cellulose membrane and chitosan-poly(vinil alcohol) blends. *Journal of Membrane Science* 251:131-136.
- Duvey, V., Saxena, C. (2002). Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology* 27:163-171.
- El-Oudiani, A., Chaabouni, Y., Msahli, S., Sakli, F. (2011). Crystal transition from cellulose I to cellulose II in NaOH treated *Agave americana* L. fibre. *Carbohydrate Polymers* 86:1221-1229.

- Etzler, F.M., Buche, M., Bobalek, J.F., Weiss, M.A. (1995). Surface free energy of paper and inks: printability issues. En: Papermakers conference proceedings. TAPPI Press. Chicago (USA). Pp:383-394.
- Fendler, A., Villanueva, M.P., Gimenez, E., Lagarón, J.M. (2007). Characterization of the barrier properties of composites of HDPE and purified cellulose fibers. *Cellulose* 14:427-438.
- Fernandes Diniz, J.M.B., Gil, M.H., Castro, J.A.A.M. (2004). Hornification-its origin and interpretation in wood pulps. *Wood Science and Technology* 37:489-494.
- Ferreira, P.J.T., Moutinho, I.M.T., Figueiredo, M.M.L. (2008). How paper topography affects contact angle measurement. En: V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel. Grafisma. Guadalajara (México). Pp:66-69.
- Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C., Joshi, C.P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19:1-13.
- Fontana, J., De Souza, A., Fontana, C., Torriani, I., Moreschi, J., Gallotti, B., De Souza, S., Narcisco, G., Bichara, J., Farah, L. (1990). *Acetobacter xylinum*; cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24-25:253-264.
- Franke-Whittle, I.H., O'Shea, M.G., Leonard, G.J., Sly, L. (2005). Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microbial Ecology* 50:128-139.
- Gao, W.H., Chen, K.F., Yang, R.D., Yang, F., Han, W.J. (2011). Properties of bacterial cellulose and its influence on the physical properties of paper. *BioResources* 6:144-153.
- Gea, S., Reynolds, C.T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., Peijs, T. (2011). Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource Technology* 102:9105-9110.

- George, J., Ramana, K.V., Sabapathy, S.N., Jagannath, J.H., Bawa, A.S. (2005). Characterization of chemically treated bacteria (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: some thermo-mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 37:189-194.
- Glazer, A.W., Nikaido, H. (1995). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press. San Francisco (USA). ISBN 0-71672608-4.
- Grant, J. (1959). *Cellulose pulp and allied products*. Interscience. New York (USA).
- Hestrin, S., Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal* 58:345-352.
- Hofenk de Graaff, J.H. (1999). Waves of knowledge, trends in paper conservation research. En: Preprint from 9th International Congress of IADA. Copenhagen, (Denmark). Pp: 9-13.
- Hon, D.N.S. (1989). Critical evaluation of mass deacidification process for book preservation. En: *Historic textile and paper materials II: Conservation and characterization*. American Chemical Society. (ACS Symposium Series 410). Washington DC (USA). Pp:13-34.
- Hotle, B.T., Considine, J.M., Wald, M.J., Rowlands, R.E., Turner, K.T. (2008). Effects of thermal aging on mechanical performance of paper. En: *Proceedings Progress in Paper Physics Seminar*. Helsinki University of Technology. Espoo (Finland). Pp:315-318.
- Hubbe, M.A., Pawlak, J.J., Koukoulas, A.A. (2008). Paper's appearance: A review. *BioResources* 3:627-665.
- Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., Kim, Y.S. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88:183-188.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000). Review: Bacterial cellulose-A masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science* 35:261-270.
- Ishikawat, A., Kuga, S., Okano, T. (1998). Determination of parameters in mechanical model for cellulose III fibre. *Polymer* 39:1875-1878.

- Jahan, M.S., Rawsan, S., Nasima Chowdhury, D.A., Al-Maruf, A. (2008). Alternative pulping process for producing dissolving pulp from jute. *BioResources* 3:1359-1370.
- Jonas, R., Farah, L.F. (1998). Production and application of bacterial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 59:101-106.
- Jroundi, F., Fernández-Vivas, A., Rodríguez-Navarro, C., Bedmar, E.J., González-Muñoz, M.T. (2010). Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Microbial Ecology* 60:39-54.
- Kai, A., Keshk, S.M.A.S. (1999). Structure of nascent microbial cellulose VI. Influence of positions of sulfonate groups in fluorescent brightener on crystal structure of microbial cellulose. *Polymer Journal* 31:61-65.
- Kajanto, I.M., Laamanen, J., Kainulainen, M. (1998). Paper bulk and surface. En: *Paper Physics; volume16* (Niskanen, K., ed.). Gummerus Printing. Helsinki (Finland). Pp:89-115.
- Karlovits, M., Gregor-Svetec, D. (2011). Comparison of durability between UV inkjet and conventional offset prints exposed to accelerated ageing. *Journal of Graphic Engineering and Design* 2:10-15.
- Kataoka, Y., Kond, T. (1999). Quantitative analysis for the cellulose I α crystalline phase in developing wood cell walls. *International Journal of Biological Macromolecules* 24:37-41.
- Keim, K. (1966). El papel. Asociación de Investigación Técnica de la Industria Papelera Española. Madrid (España).
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. (2006). The family *Acetobacteraceae*: The genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. En: *The Prokaryotes* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds.). Springer-Verlag, New York (USA). Pp:163-200.
- Keshk, S.M.A.S., Razek, T.M.A., Sameshima, K. (2006). Bacterial cellulose production from beet molasses. *African Journal of Biotechnology* 5:1519-1523.
- Keshk, S.M.A.S., Sameshima, K. (2005). Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology* 4:478-482.

- Khan, A., Huq, T., Khan, R.A., Riedl, B., Lacroix, M. (2014). Nanocellulose-based composites and bioactive agents for food packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:163-174.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition* 50:5438-5466.
- Klemm, D., Philipp. B., Heinze. T., Heinze. U., Wagenknecht. (1998). *Comprehensive cellulose chemistry; volume1: Fundamentals and analytical methods*. Wiley-VCH. New York (USA). ISBN 3-527-29413-9.
- Klemm, D., Shuman, D., Udhardt, U., Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* 26:1561-1603.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1997a). Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84:124-127.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1998). Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85:318-321.
- Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1997b). Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83:371-376.
- Lapierre, L., Bouchard, J., Berry, R. (2009). The relationship found between fiber length and viscosity on three different commercial kraft pulps. *Holzforschung* 63:402-407.
- Legnani, C., Vilani, C., Calil, V.J., Barud, H.S., Quirino, W.G., Achete, C.A., Ribeiro, S.J.L., Cremona, M., (2008). Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. *Thin Solid Films* 517:1016-1020.
- Le Moigne, N., Navard, P. (2010). Dissolution mechanisms of wood cellulose fibres in NaOH–water. *Cellulose* 17:31-45.

- Li, F., Zhu, C., You, Q., Lu, S., Wang, Q., Lin., Zhang, T. (2009). In vivo evaluation of the biocompatibility of tissue-engineered tubular nanometer bacterial cellulose. *Chinese Journal of Biomedical Engineering* 28:760-765.
- Li, Y., Tian, C., Tian, H., Zhang, J., He, X., Ping, W., Lei, H. (2012). Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:1479-1487.
- Lienardy, A., Van Damme, P., Van Schoute, B., Vandepiassche, G., De Meyer, M., Van Droogenbroeck, M., Rombauts, W. (1994). *Papier en péril*. Institut Royal du Patrimoine Artistique. Bruxelles (Belgique).
- Lojewska, J., Missori, M., Lubanska, A., Grimaldi, P., Zieba, K., Proniewicz, L.M., Congiu-Castellano, A. (2007). Carbonyl groups development on degraded cellulose. Correlation between spectroscopic and chemical results. *Applied Physics A-Materials Science* 89:883-887.
- Maneerung, T., Tokura, S., Rujiravanit, R. (2008) Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers* 72:43-51.
- Marx-Figini, M., Pion, B.G. (1974). Kinetics investigation on biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 338:382-393.
- Matthews, J.F., Skopec, C.E., Mason, P.E., Zuccato, P., Torget, R.W., Sugiyama, J., Himmel, M.E., Brady, J.W. (2006). Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. *Carbohydrate Research* 341:138-152.
- Meftahi, A., Khajavi, R., Rashidi, A., Sattari, M., Yazdanshenas, M.E., Torabi, M. (2010). The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose* 17:199-204.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., Gidley, M. J. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC53524. *Journal of Applied Microbiology* 107:576-583.
- Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews* 40:3941-3994.

- Morrow, C. C., Walker G. (1983). The preservation challenge: a guide to conserving library materials. Knowledge Industry Publications. White Plains, (USA).
- Moura, M. J., Ferreira, P. J., Figueiredo, M. M. (2005). Mercury intrusion porosimetry in pulp and paper technology. Powder Technology 160:61-66.
- Moutinho, I., Figueiredo, M., Ferreira, P.J. (2004). Influência dos agentes de colagem superficial na estrutura do papel – uma análise química. En: Proceedings of III CIADICYP. INIA. Madrid (España). Pp:377-383.
- Nakagaito, A.N., Iwamoto, S., Yano, H. (2005). Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. Applied Physics A: Materials Science & Processing 80:93-97.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1998). Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. Journal of Fermentation and Bioengineering. 85:598-603.
- Nguyen, V.T., Flanagan, B., Gidley, M.J., Dykes, G.A. (2008). Characterization of cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. Current Microbiology 57:449-453.
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, W., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S. (1990). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose-part2. Improvement of the mechanical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electroacoustic transducers. Journal of Materials Science 25:2997-3001.
- Nwe, N., Furuike, T., Tamura, H. (2010). Selection of a biopolymer based on attachment, morphology and proliferation of fibroblast NIH/3T3 cells for the development of a biodegradable tissue regeneration template: Alginate, bacterial cellulose and gelatin. Process Biochemistry 45:457-466.
- O'Sullivan, A. (1997). Cellulose: The structure slowly unravels. Cellulose 4:173-207.

- Owen, A., Fiske, B., Barrett, T., McClintock, T.K., Volent, P., Nicholson, K., Kruth, L., Rodger, S. (1988). Lining. En: Paper Conservation Catalog. American Institute for Conservation Book and Paper Group. Washington D.C (USA).
- Owens, D.K, Wendt, R. C. (1969). Estimation of the surface free energy of polymers. Journal of Applied Polymer Science 13:1741-1747.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Uría, M.A., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F.J., de Miguel, M.P. (1997). Citología e histología vegetal y animal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid (España).
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. Biotechnology for Biofuels 3:1-10.
- Park, J. K., Jung, J. Y., Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. Biotechnology Letters 25:2055-2059.
- Peraza, C., Guindeo, A., García, L. Laín, L. (1993). Tecnología de la madera I. Fundación Conde del Valle de Salazar. Madrid (España). ISBN: 84-86793-20-3.
- Plackett, D.V., Letchford K., Kackson J.K., Burt, H.M. (2014). A review of nanocellulose as a novel vehicle for drug delivery. Nordic Pulp & Paper Research Journal 29:105-118
- Poletto, M., Pistor, V., Zeni, M., Zattera, A. J. (2011). Crystalline properties and the composition kinetics of cellulose fibers in wood pulp obtained by two pulping processes. Polymer Degradation and Stability 96:679-985.
- Pommet, M., Juntaro, J., Heng, J.Y.Y., Mantalaris, A., Lee, A.F., Wilson, K., Kalinka, G., Shaffer, M.S.P., Bismarck, A. (2008). Surface modification of natural fibers using bacteria: depositing bacterial cellulose onto natural fibers to create hierarchical fiber reinforced nanocomposites, Biomacromolecules 9:1643-1651.
- Pourramezan, G. Z., Roayaei, A. M., Qezelbash, Q. R. (2009). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2. Biotechnology 8:150-154.

- Princi, E (2011). Handbook of polymers in paper conservation. Smithers Rapra Technology. ISBN: 9781847355799.
- Ramana, K. V., Tomar, A., Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16:245-248.
- Rani, M.U., Appaiah, A. (2011). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. Annals of Microbiology 61:781-787.
- Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Gañán, P., de la Caba, K., Mondragon, I. (2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships. Cellulose 17:661-669.
- Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiology Reviews 55:35-38.
- Saibuatong, O., Phisalaphong, M. (2010). Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. Carbohydrate Polymers 79:455-460.
- Sánchez Hernamperez, A. (2012). La química de los libros: ciencia y conservación del patrimonio documental: Museo de la Biblioteca Nacional de España, Sala de las Musas. Madrid (España). NIPO 552-11-001-4. <http://datos.bne.es/edicion/a5130615.html>.
- Sánchez Hernampérez, A. (1999). Políticas de conservación en bibliotecas. Arco Libros. Madrid (España). ISBN: 84-7635-393-6.
- Schramm, M., Hestrin, S. (1954). Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. Journal of General Microbiology 11:123-129.
- Schumann, D., Wippermann, J., Klemm, D.O., Kramer, F., Koth, D., Kosmehl, H., Wahlers, T., Salehi-Gelani, S. (2009). Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. Cellulose 16:877-885.
- Schwederdt, P. (1989) Mass deacidification procedures for libraries and archives: state of development and perspectives for implementation in the Federal Republic of Germany. The Commission on Preservation and Access. Washington (USA).

- Serafica, G., Mormino, R., Bungay, H. (2002). Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:756-760.
- Shen, W., Chen, S., Shi, S., Li, X., Zhang, X., Hu, W., Wang, H. (2009). Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto diethylenetriamine-bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers* 75:110-114.
- Shen, W., Filonako, Y., Truong, Y., Parker, I.H., Brack, N., Pigram, P., Liesegang, J. (2000). Contact angle measurement and surface energetics of sized and unsized paper. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 173: 117-126.
- Shibazaki, H., Kuga, S., Onabe, F., Usuda, M. (1993). Bacterial cellulose as a separation medium. *Journal of applied Polymer Science* 50:965-969.
- Shoda, M., Sugano, Y. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10:1-8.
- Sjöström, E. (1993). *Wood chemistry: Fundamentals and applications*. Academic Press. ISBN: 978-0126474817.
- Smith R.D. (1972). A comparison of paper in identical copies of books from the Lawrence University, the Newberry and the New York Public Libraries. *Restaurator*, suppl. 2:1-76.
- Smith, R. D. (1987). Deacidifying library collections: myths and realities. *Restaurator* 8:71-72
- Smook, G.A. (1990). *Handbook for pulp and paper technologists* TAPPI Press. Atlanta (USA).
- Sokolnicki, A.M., Fischer, R.J., Harrah, T.P., Kaplan, D. (2006). Permeability of bacterial cellulose membranes. *Journal of Membrane Science* 272:15-27.
- Son, H.J., Heo, M.S., Kim, Y.G., Lee, S.J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology Applied Biochemistry* 33:1-5.
- Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Tache, F., Zaharescu, T., Grosu, E. (2007). Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 265:434-438.

- Sugiyama, J., Persson, J., Chanzy, H. (1991). Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native cellulose. *Macromolecules* 24:2461-2466.
- Sun, D., Yang, J., Li, J., Yu, J., Xu, X., Yang, X. (2010). Novel Pd-Cu/bacterial cellulose nanofibers: Preparation and excellent performance in catalytic denitrification. *Applied Surface Science* 256:2241-2244.
- Surma-Ślusarska, B., Danielewicz, D., Presler, S. (2008). Properties of composites of unbeaten birch and pine sulphate pulps with bacterial cellulose. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 16:127-129.
- Swain, P.S., Lipowsky, R. (1998). Contact angle on heterogeneous surfaces: A new look at Cassie's and Wenzel's laws. *Langmuir* 14:6772-6780.
- Swissa, M., Aloni, Y., Weinhouse, H., Benizman, M. (1980). Intermediary steps in cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. *Journal of Bacteriology* 143:1142-1150.
- Tåg, C.M., Pykönen, M., Rosenholm, J.B., Backfolk, K. (2009). Wettability of model fountain solutions: The influence on topo-chemical and –physical properties of offset paper. *Journal of Colloid and Interface Science* 330:428-436.
- Thompson, D., Hamilton, M. (2001). Production of Bacterial Cellulose from Alternate Feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93:503-513.
- Torres, F.G., Troncoso, O.P., Torres, C., Grande, C.J. (2013). Cellulose based blends, composites and nanocomposites. En: *Advances in Natural Polymers. Composites and Nanocomposites* (Sabu T, Visakh PM, Mathew, Aji P, eds). Springer. New York (USA). Pp :21-54.
- Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. (1995). Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59:1498-1502.
- Tsuchida, T., Yoshinaga, F. (1997). Production of bacterial cellulose by agitation culture systems. *Pure and Applied Chemistry* 69:2453-2458.

- Vaarsalo, J (2000). Optical properties of paper. En: Pulp and Paper Testing. Papermaking Science and Technology. Book 17 (Levlin, J.E., Söderhjelm, L., eds.). Fapet-Oy. Helsinki (Finland). Pp:163-181. ISBN: 952-5216-17-9.
- Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* 59:93-99.
- Van der Reyden, D., Baker, M., Hoffman, C. (1993). Effects of aging and solvent treatments on some properties of contemporary tracing papers. *Journal of the American Institute for Conservation* 31:177-206.
- Velasco-Bedrán, H., López-Isunza, F. (2007). The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. *Process Biochemistry* 42:1180-1190.
- Vergara Peris, J. (2002), Conservación y restauración de material cultural en archivos y bibliotecas. Generalitat Valenciana, Valencia (España). ISBN. 84-482-3077-9.
- Vijayendra, S.V.N., Shamala, T.R. (2014). Film forming microbial biopolymers for comercial applications-A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 34:338-357.
- Virginia Tech, "Invention controls weavers of nanoscale biomaterials", <http://www.vtnews.vt.edu/articles/2008/11/2008-693.html>.
- Wada, M., Ikeb, M., Tokuyasub, K. (2010). Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. *Polymer Degradation and Stability* 95:543-548.
- Wang, J., Gao, C., Zhang, Y., Wan, Y. (2010). Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial. *Materials Science and Engineering C* 30:214-218.
- Wanichapichart, P., Kaewnopparat, S., Buaking, K., Puthai, W. (2002). Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 24:855-862.

- Watanabe, K., Eto, Y., Takano, S., Nakamori, S., Shibai, H., Yoshinaka, S. (1993). A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. *Cytotechnology* 13:107-114.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* 5:187-200.
- Wächter, W. (1989). Les techniques de conservation de masse des ouvrages de bibliothèque et des archives. UNESCO. Paris (France).
- Weinhouse, H., Benziman, M. (1974). Regulation of hexose phosphate metabolism in *Acetobacter xylinum*. *Biochemical Journal* 138:537-542.
- Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P., Benziman, M. (1997). c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 416:207-211.
- Wu, S., Li, M., Fang, B., Tong, H. (2012). Reinforcement of vulnerable historic silk fabrics with bacterial cellulose film and its light aging behavior. *Carbohydrate Polymers* 88:496-501.
- Wu, S., Lia, Y. (2008). Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 54:103-108.
- Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S Ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61:1244-1251.
- Yamanaka, S., Ishihara, M., Sugiyama, J. (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* 7:213-225.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheet prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science* 24:3141-3145.
- Yamanaka S., Watanabe K., Suzuki Y. (1990). Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose. EP039344A2

- Yamauchi, T., Murakami, K. (2001). Porosity and gas permeability. En: Handbook of Physical Testing of Paper, vol.2 (Borch, J., Lyne, M.B., Mark, R.E., eds). New York (USA). Pp:267-302.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., Watanabe, K. (1997). Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61:219-224.
- Young, R. A. (1994). Comparison of the properties of chemical cellulose pulps. Cellulose 1:107-130.
- Yousefi, H., Faezipour, M., Hedjazi, S., Mousavi, M.M., Azusa, Y., Heidaria, A.H. (2013). Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers/ground cellulose nanofibers of canola straw. Industrial Crops and Products 43:732-732.
- Yunoki, S., Osada, Y., Kono, H., Takai, M. (2004). Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: Analysis using ¹³C-labeled carbon sources. Food Science and Technology Research 10:307-313.
- Zaar, K. (1977). The biogenesis of cellulose by *Acetobacter Xylinum*. Cytobiologie 16:1-15.
- Zaborowska, M., Bodin, A., Bäckdahl, H., Poppe, J., Goldstein, A., Gatenholm, P. (2010). Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. Acta Biomaterialia 6:2540-2547.
- Zou, X., Uesaka, T., Gurnagul, N. (1996). Prediction of paper permanence by accelerated aging I. Kinetic analysis of the aging process. Cellulose 3:243-267.
- Zugenmaier, P. (2001). Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. Progress in Polymer Science 26: 1341-1417.
- Zuo, K., Cheng, H., Wu, S., Wu, W. (2006). A hybrid model combining hydrodynamic and biological effects for production of bacterial cellulose with a pilot scale airlift reactor. Biochemical Engineering Journal 29:81-90.

VII.- ANEXOS

The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Bacterial Cellulose Production and Properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 Focused on its use in Degraded Paper Restoration

Sara M. Santos, José M. Carbajo, and Juan C. Villar *

Bacterial cellulose (BC) synthesized by *Gluconacetobacter sucrofermentans* has a high degree of crystallinity, durability, great resistance, and biocompatibility. This study evaluates the effect that carbon and nitrogen sources, present in HS (Hestrin–Schramm) culture medium, have on BC from *G. sucrofermentans* CECT 7291 used to restore damaged documents. The initial pH of the medium and the temperature were set for all assays, which were conducted in static conditions. The cellulose layers were obtained at four time points. The growth media were characterized at each time point (pH and carbon source consumption). Cellulose layers were washed, pressed, dried, and characterized by determining their pH, dry weight, and optical and mechanical properties. The best combination of carbon and nitrogen sources proved to be fructose plus yeast extract–corn steep liquor, with or without ethanol, which provided a good balance between BC production and carbon source consumption, and generated a resistant and homogeneous cellulose layer.

Keywords: Bacterial cellulose; *Gluconacetobacter*; Carbon source; Nitrogen source; Paper restoration

Contact information: INIA-CIFOR, Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain;

*Corresponding author: villar@inia.es

INTRODUCTION

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth. It is produced by a great variety of organisms, including vascular plants, marine algae, and prokaryotic organisms. Bacterial cellulose (BC) is an insoluble exopolysaccharide generated by bacterial species, for example those of the genera *Acetobacter*, *Agrobacterium*, and *Aerobacter* (Shoda and Sugano 2005).

The genus *Acetobacter* refers to a group of bacteria that have the ability to oxidize sugars, sugar alcohols, and ethanol, producing acetic acid as the major end product. In particular, *A. xylinum* effectively synthesizes cellulose as a primary metabolic product. *A. xylinum* was reclassified as *Gluconacetobacter xylinus* and assigned to the novel genus *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.* 1997), which also includes *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens*, and *G. intermedius*. *G. xylinus* BPR2001 is the only strain of the subspecies *G. xylinus* subsp. *sucrofermentans*. Selected for its ability to produce cellulose (Toyosaki *et al.* 1995), this bacterial strain has been recently reclassified as a separate species and named *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Cleenwerck *et al.* 2010).

G. sucrofermentans is a rod-shaped, obligate aerobic, gram-negative bacterium (Kersters *et al.* 2006). BC synthesized by *G. sucrofermentans* has specific physical and chemical properties that distinguish it from plant cellulose, such as high crystallinity

(more than 60%), chemical purity, mechanical strength, high water-holding capacity, and biocompatibility (Ross *et al.* 1991). For example, when compared to plant cellulose, BC ribbons are only one-hundredth in width (Shoda and Sugano 2005) and two orders of magnitude higher in tensile strength (Yamanaka *et al.* 1989).

BC synthesis occurs as a multi-step series of chemical reactions beginning with the incorporation of monomeric glucose into a polyglucosan (Jonas and Farah 1998). A single bacterial cell may polymerize up to 200,000 molecules of glucose per second into β -1,4-glucan chains (Hestrin and Schramm 1954) that aggregate into subfibrils. These subfibrils are extruded through pores arranged on the cell surface forming a row along the longitudinal axis. Approximately 10–100 subfibrils aggregate to form crystalline microfibrils about 3.5 nm in diameter (Jonas and Farah 1998). Subsequently, these microfibrils are gathered into bundles, which group to form ribbons (Yamanaka *et al.* 2000). These ribbons interact with ribbons from other cells, forming a two-dimensional layer. Finally, parallel layers interact with one another by hydrogen bonds and Van der Waals forces, forming a gelatinous suspension in the liquid medium (Brett 2000). Initially, each BC layer contains absorbed water that can be removed, leaving chemical groups available for the creation of new hydrogen bonds between adjacent cellulose chains, a process that increases crystallinity (Colvin and Leppard 1977).

The macroscopic morphology of BC depends on the culture conditions (Yamanaka *et al.* 2000). In a static culture, a gelatinous membrane of cellulose fibers is formed (Czaja *et al.* 2004). The result is high mechanical strength and crystallinity (60% to 80%). However, in an agitated culture, cellulose mats interconnect less frequently, forming irregular granules (Vandamme *et al.* 1998).

In their natural habitat, *Gluconacetobacter* species grow in fruits, flowers, and degraded food. These bacteria live entrapped in a mesh of cellulose, synthesized by themselves. This cellulose mesh keeps the organisms in close contact with oxygen from the air and also fixed to the substrate (Hestrin and Schramm 1954; Williams and Cannon 1989). Okamoto *et al.* (1994) suggested that BC actually plays a role as a food reservoir and can be consumed by the microorganisms if other nutrients get scarce.

Thanks to its unique properties, BC has multiple applications in fields as diverse as the paper, textile, and food industries, and is also used as a biomaterial for manufacturing cosmetics, artificial skin, artificial blood vessels, and high-fidelity speakers (Chawla *et al.* 2009). Its application in the restoration of old paper documents has apparently not been sufficiently explored yet, although its biocompatibility and exceptional mechanical properties make BC an optimal candidate for this purpose.

Several studies have focused on the mechanism of synthesis of this biopolymer, as well as on its structure and properties (Hestrin and Schramm 1954; Kai and Keshk 1999). The most relevant culture parameters for BC production are the cultivation method (static or agitated), the carbon and nitrogen sources, the pH, and the temperature (Chawla *et al.* 2009). Those studies that have evaluated different pH settings have shown that optimum values range from 4.5 to 7.5 with the greatest efficacy being located around 6.5 (Son *et al.* 2001; Çoban and Biyik 2011). The optimum temperature for BC production is 30 °C (Son *et al.* 2001; Pourramezan *et al.* 2009).

Efficient cellulose production by this bacterium lies in its ability to synthesize glucose from the carbon substrate, followed by its polymerization to cellulose. Different carbon sources, such as mono- and oligosaccharides, alcohols, and acids have been tested to maximize BC production by several *G. xylinum* strains (Chawla *et al.* 2009). For instance, cellulose yields have been the highest when using sucrose and glycerol as

carbon substrates for the *G. xylinus* strain ATCC 53524 (Mikkelsen *et al.* 2009); sucrose also gave the best result with *Acetobacter* sp. 4B-2 (Pourramezan *et al.* 2009); glycerol was the best substrate for *G. xylinus* ATCC 10245 (Keshk and Sameshima 2005); and glucose was found to be the best carbon source for *Acetobacter lovaniensis* HBB5 (Çoban and Biyik 2011). Cellulose yields are also maximized with particular sources of nitrogen. Which source of nitrogen provides the highest cellulose yield varies depending on the bacterial strain that is to be used. For example, Çoban and Biyik (2011) selected yeast extract for BC production with *Acetobacter lovaniensis* HBB5, while Rani and Appaiah (2011) found that corn steep liquor (CSL) is an effective nitrogen source for *G. hansenii* UAC09. The same nitrogen source, CSL, was the most suitable one for BC production with *G. sucrofermentans* (Tsuchida and Yoshinaga 1997). Only a few reports evaluated the combined effect that the selection of carbon and nitrogen sources has on BC production by *A. xylinum*, although Ramana *et al.* (2000) proposed different combinations that efficiently produce BC.

Naritomi *et al.* (1998) observed that the supplementation of 1% ethanol to a medium containing 30 g/L of fructose increases BC production by *G. sucrofermentans* BPR3001A. This study also suggests that ethanol acts not as a substrate for BC biosynthesis but as an energy source for ATP generation in the viable cells, increasing BC production as a result. Similar results have been found in studies with *G. hansenii*, (Park *et al.* 2003) and with *A. xylinum* ATCC 10245 (Yunoki *et al.* 2004). In the latter report, the authors suggest that ethanol was not the carbon source for BC production and that the improvement was a consequence of ethanol suppressing the transformation of glucose in gluconic acids, a process that potentiates a more efficient polymerization of glucose into BC. However, if the ethanol percentage is increased over 1.5%, BC production decreases due to the inhibition of cell growth caused by the accumulation of acetate (Naritomi *et al.* 1998; Park *et al.* 2003).

All this evidence shows that there is no pattern of bacterial behavior in a given species that can lead to the selection of the most appropriate carbon and nitrogen sources for BC production. In these studies, the rate of BC production has been prioritized as the criterion for selecting growth conditions. As BC has shown promising results in areas as diverse as medicine and materials science (Chawla *et al.* 2009), quality criteria must also be considered in the selection of the most appropriate carbon and nitrogen sources. Thus, in the field of research of old paper restoration, there are parameters, such as mechanical strength, brightness, or yellowness of the BC, that are paramount when deciding whether or not to implement its use. Some studies have assessed the mechanical properties of paper made by mixing a low percentage of BC and vegetal cellulose (Surma-Ślusarska *et al.* 2008; Basta and El-Saied 2009; Gao *et al.* 2011), but there are almost no studies about the mechanical properties of paper made exclusively of BC (Yamanaka *et al.* 1989, Gea *et al.* 2011).

This project aims for the production of high-quality BC from *G. sucrofermentans* CECT 7291 to be used in the restoration of old papers. To achieve this goal, the objectives were the selection of carbon and nitrogen sources capable of providing cellulose pellicles with high strength and adequate brightness, and the study of the relationship between the physical properties of BC and the culture conditions.

EXPERIMENTAL

Microorganism and Culturing Maintenance

Gluconacetobacter sucrofermentans (previously known as *Gluconacetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans*) CECT 7291 was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT). For maintenance it was subcultured periodically in HS medium (Hestrin and Schramm 1954) containing the following ingredients: glucose, 20 g/L; yeast extract, 5 g/L; peptone, 5 g/L; Na₂HPO₄, 2.7 g/L; and citric acid, 1.15 g/L. Agar was added in a final concentration of 15 g/L to solidify the culture media. Petri dishes were incubated at 30 °C for 4 days and were kept at 4 °C afterwards.

Culture Conditions

G. sucrofermentans was grown in HS solid media placed in Petri dishes for 6 days in order to obtain the suspension of bacterial cells to be used in the experiments. 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of liquid HS media were inoculated with these plates and cultivated in static conditions for 4 days. Subsequently, the pellicles formed were cut in small pieces (about 1 × 1 cm) in sterile conditions and shaken with the liquid media at 700 rpm for 30 min. The suspension obtained was filtered through gauze, centrifuged at 4000 rpm for 10 min and, after removing the supernatant, the pellet was washed with Ringer's solution (NaCl, 2.5 g/L; KCl, 0.105 g/L; CaCl₂•2H₂O, 0.120 g/L; and NaHCO₃, 0.05g/L). This solution was centrifuged again in the same conditions and the pellets were re-suspended in a small volume of Ringer's. The optical density of the solution was adjusted to 0.59–0.64 with a wavelength of 600 nm, diluting with Ringer's solution. An amount of 250 µL of the final solution was used to inoculate 100 mL of media.

For the carbon source experiments, glucose was substituted with fructose, sucrose, mannitol, or glycerol in the HS media, always at a final concentration of 20 g/L. For the nitrogen source experiments, HS media were prepared with the carbon source selected in the previous experiment; the original nitrogen sources (peptone and yeast extract) were replaced by different types of nitrogen sources: defined organic (asparagine), complex organic (yeast extract, CSL), ammonium inorganic (ammonium sulfate), and nitric inorganic (potassium nitrate). The combinations tested were: peptone–asparagine, yeast extract–asparagine, peptone–potassium nitrate, yeast extract–potassium nitrate, peptone–ammonium sulfate, yeast extract–ammonium sulfate, peptone–corn steep liquor, and yeast extract–corn steep liquor (CSL was obtained from Sigma-Aldrich, peptone and yeast extract from Cultimed). All these nitrogen sources were always added to obtain a final concentration of 5 g/L for each one of them. HS media, modified with the selected carbon and nitrogen sources, was supplemented with 1% ethanol to test its influence. Ethanol was sterilized by filtration and added in sterile conditions to the media.

In all cases, 100 mL of liquid medium was added to 150-mm Petri dishes, inoculated with the suspension described above, and cultivated at 30 °C under static conditions. A total of 20 plates per source were analyzed after 4, 7, 10, and 13 days of cultivation, 5 plates each day.

Culture Media Characterization

At each condition and time point, the pH was determined in the residual culture medium. Also, the concentration of the residual carbon source was measured using specific enzymatic kits provided by Megazyme.

Cellulose Characterization

The cellulose pellicle was washed thoroughly with distilled water and its pH was measured using a surface electrode. To eliminate bacterial cells, the pellicles were incubated at 90 °C in 1% NaOH for 30 min. Next, the pellicles were washed with distilled water again and the surface pH was measured using a pH-meter with a surface electrode. Cellulose films were prepared by filtering through a Buchner funnel of adequate diameter. For this purpose, a filter paper with a medium flow rate was used (PRAT DUMAS A150600), which subsequently was pressed at 2 kg/cm² for 1 h. Dry films were conditioned under standard conditions (23 °C and 50% relative humidity) and characterized. This characterization consisted in determining their grammage (ISO 536), yellowness, opacity (ISO 2471), and burst (ISO 2758) and tear (ISO 1974) indexes, with 5 repetitions per grammage test, 20 per optical properties, 8 per burst index test, and 4 per tear index test at each time point.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbon Source Selection

The effectiveness for cellulose production is shown in Fig. 1. The pattern of carbon source consumption changes depending on the source. Thus, glycerol and fructose are consumed slowly. On the other hand, glucose, sucrose, and mannitol cause a quick response; in these cases, after 7 days (2nd sampling) less than 20% of the initial carbon source remains.

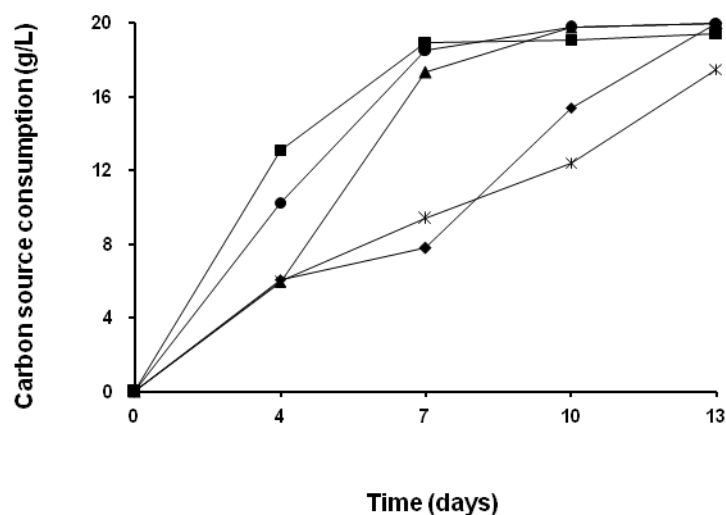


Fig. 1. Carbon source consumption. (♦) Glycerol, (■) Glucose, (▲) Sucrose, (●) Mannitol, and (×) Fructose

This pattern of consumption does not have a direct relationship to the production of cellulose (Fig. 2), as the efficiency in the utilization of the carbon source varies. With glucose and sucrose, a small amount of cellulose is produced with the maximum within a short time, while with glycerol, mannitol, and fructose, cellulose is produced consistently until the end of the test and in a greater amount than with glucose and sucrose. Different rates of production depending on the carbon source have already been described by Mikkelsen *et al.* (2009). These authors also observed that BC production started later with sucrose than with the other carbon sources. The onset delay for BC production with sucrose may be because it has to be hydrolyzed to glucose and fructose in the periplasm due to the impossibility of transporting sucrose through the cell membrane, (Velasco-Bedrán and López-Isunza 2007). Keshk and Sameshima (2005) studied glucose, glycerol, and fructose as carbon sources and obtained similar results regarding carbon source consumption but found a different behavior of BC production.

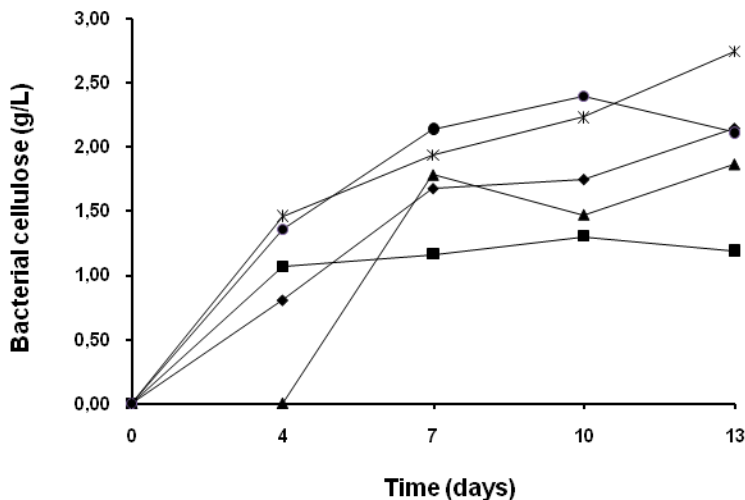


Fig. 2. BC production for different carbon sources. (♦) Glycerol, (■) Glucose, (▲) Sucrose, (●) Mannitol, and (×) Fructose

The differences observed among carbon sources may be a consequence of there being two major operative amphibolic pathways: the pentose phosphate cycle and the Krebs cycle, both for the oxidation of carbohydrates (Ross *et al.* 1991). At any rate, Mikkelsen *et al.* (2009) concluded that the products formed are indistinguishable, from the point of view of its molecular and microscopic characteristics, regardless of the carbon source that is used.

This study's results indicate that BC production improves when the carbon source for *G. sucrofermentans* is fructose, as a considerable amount of cellulose is produced (2.7 g/L) without exhausting the available carbon source.

Another interesting parameter to be considered when selecting the carbon source is the pH. If the BC is going to be generated directly on a material which could be degraded below a certain pH, as is the case with some ancient historical documents, an adequate pH must be obtained in order to avoid the acid hydrolysis of cellulose paper,

although *G. xylinum* tolerates acid and would be able to grow at a pH as low as 3.5. As Fig. 3 shows, in media with fructose, mannitol, and glycerol, the pH decreases less than a unit (final value 5.5–6.0), which is compatible with paper restoration. However, in the case of media with glucose and sucrose, the pH decreases below 4.5. These results are consistent with those of Keshk and Sameshima (2005). This rapid drop in pH is caused by the known conversion of glucose to gluconic acid (Hwang *et al.* 1999). Sucrose induces a similar decrease of the pH, although this effect is less pronounced because it dissociates into glucose and fructose, so the glucose available to convert into gluconic acid is just half the amount. After washing the BC pellicles with NaOH and distilled water, their pH, which originally was that of the growth media, becomes independent of the carbon source. Therefore, the pH of the BC pellicles is an issue only if cellulose is generated on the paper that is to be restored, but not if cellulose is collected from the bacterial growth media first and applied to the paper later. If the situation is the former, glucose and sucrose should not be used as carbon sources.

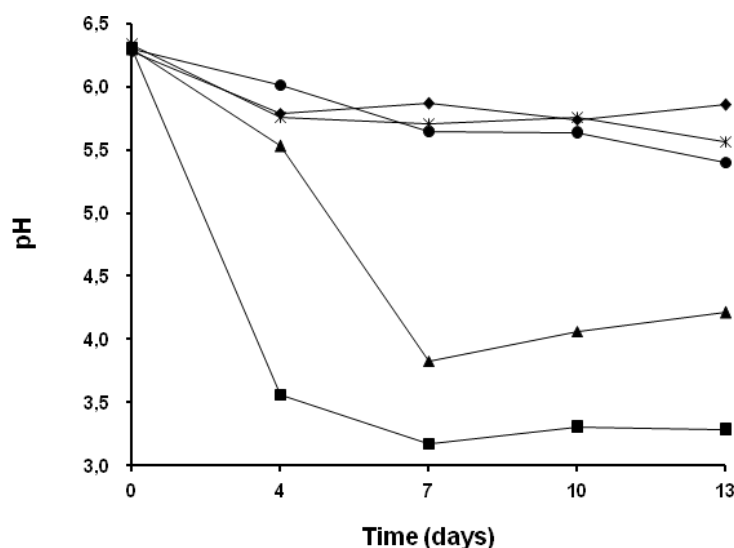


Fig. 3. Carbon source selection: Culture media pH. (♦) Glycerol, (■) Glucose, (▲) Sucrose, (●) Mannitol, and (×) Fructose

The mechanical and optical properties of BC are subject to variability (Table 1). Thus, the burst index varies between 5 and 15 kPa m²/g with no apparent pattern. In all cases the values of this parameter were higher than those typically found in the paper industry. In the paper industry, the presence of more fiber–fiber bonds, which is achieved by refining, implies higher burst and tensile strength (Smook 1990). The presence of numerous fiber-fiber bonds in BC cellulose films comes from the very fine size of BC fibers that leads to their very high surface area available, hence the high values of burst index. The tear strength values are widely dispersed and always low regardless of the carbon source, which is consistent with findings reported by Surma-Ślusarska *et al.* (2008).

The optical properties of BC (Table 1) also show a dispersed distribution, especially yellowness, which ranges from 10% to 40%, but with no clear trend. It should be borne in mind that the optical properties may subsequently be modified by various

treatments (bleaching, mineral addition, colorants, fluorescence whitening agents, *etc.*) to fit the final use of the BC.

Examining BC production rate and its properties enabled selection of the most appropriate carbon source to perform the second part of this study, which focused on the nitrogen source. It was always clear that all mechanical properties had high enough values, regardless of the carbon source, and that the optical properties were also acceptable. Therefore, the main criterion that the choice was based on was a high BC production rate at an adequate pH. This criterion sets fructose as the best carbon source. Consequently, fructose was used as the carbon source in the experiments described below, which were conducted to select the most appropriate nitrogen source.

Table 1. Variation of Optical and Mechanical Properties of BC Layers at Different Time Points Depending on the Carbon Source Used

Carbon Source	Time (days)	Burst Index (kPa m ² /g)	Tear Index (mN m ² /g)	Opacity (%)	Yellowness (%)
Glucose	4	7.60	2.10	20.85	12.80
	7	11.7	3.30	17.75	10.41
	10	10.2	1.50	21.75	25.15
	13	9.60	2.80	15.24	20.35
Fructose	4	10.4	0.90	20.13	20.17
	7	11.4	1.50	16.93	36.03
	10	6.60	0.60	71.41	39.27
	13	7.00	0.80	20.56	33.48
Sucrose	4	a	a	a	a
	7	6.70	1.10	12.67	14.89
	10	5.20	1.20	13.24	30.76
	13	11.0	1.80	17.56	29.96
Glycerol	4	b	2.20	15.13	2.41
	7	11.7	1.70	17.14	35.03
	10	14.9	1.70	24.43	30.51
	13	13.6	1.00	23.00	30.97
Mannitol	4	10.3	2.70	16.32	19.11
	7	13.5	1.60	15.83	38.41
	10	12.9	1.40	16.26	40.71
	13	12.0	0.90	18.62	14.26
a, BC layer not formed; b, under the sensibility limit					

Nitrogen Source Selection

Previous experiments on solid medium have shown that *G. sucrofermentans* CECT 7291 does not grow in the absence of organic nitrogen. This is consistent with the results that Rani and Appaiah (2011) report for *G. hansenii* UAC09 and Son *et al.* (2001) for *Acetobacter* sp. A9. Therefore, a source of organic nitrogen was included in all combinations: yeast extract–peptone (YE+P), yeast extract–asparagine (YE+Asn), yeast extract–potassium nitrate (YE+KNO₃), yeast extract–ammonium sulfate (YE+(NH₄)₂SO₄), yeast extract–corn steep liquor (YE+CSL), peptone–asparagine (P+Asn), peptone–potassium nitrate (P+KNO₃), peptone–ammonium sulfate (P+(NH₄)₂SO₄), and peptone–corn steep liquor (P+CSL).

At the end of the assay, the following combinations did not yield any BC: P+Asn, P+KNO₃, P+(NH₄)₂SO₄, and YE+(NH₄)₂SO₄. It was decided to proceed with these assays for a longer time. Only the combination YE+(NH₄)₂SO₄ ended up producing a cellulose

layer, but it was not used because of its very low yield. The rest of the fructose consumption and cellulose production data are shown in Fig. 4 and Fig. 5.

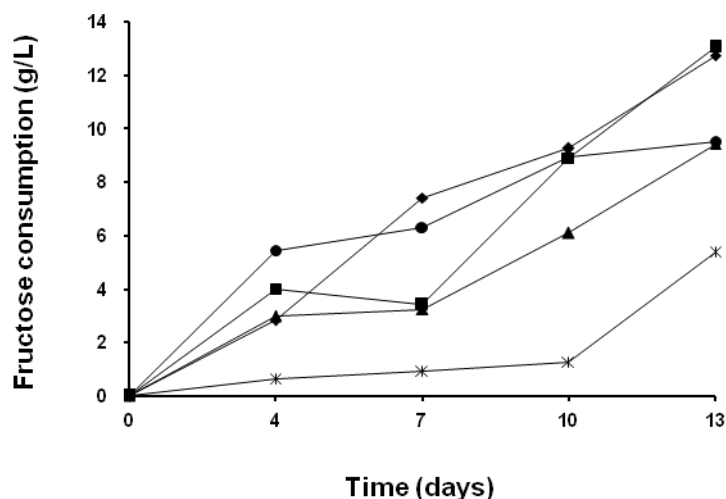


Fig. 4. Nitrogen source selection: Fructose consumption. (♦) YE+P, (■) YE+CSL, (▲) YE+Asn, (●) P+CSL, and (×) YE+KNO₃

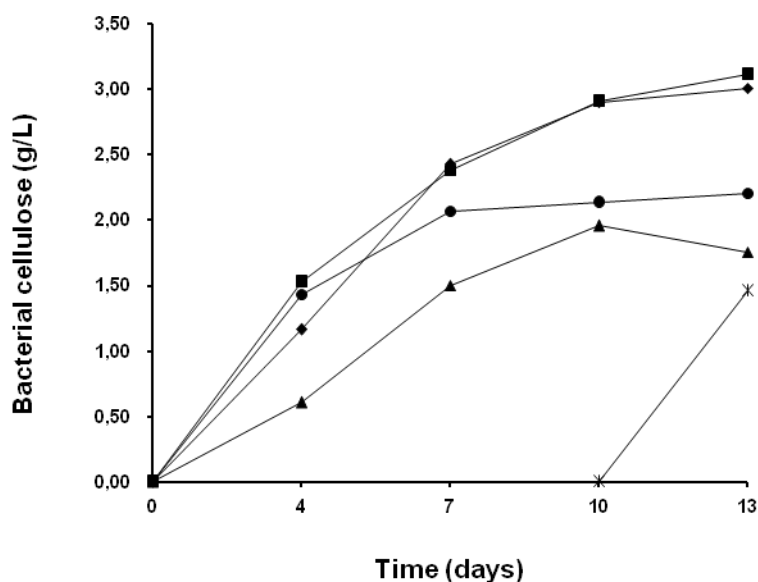


Fig. 5. Nitrogen source selection: BC production. (♦) YE+P, (■) YE+CSL, (▲) YE+Asn, (●) P+CSL, and (×) YE+KNO₃

Of all the tested combinations that produce BC, the only one in which an inorganic nitrogen source was used (YE+KNO₃) resulted in low fructose consumption and low cellulose production from day 10, which is an indication of low bacterial growth. With the use of asparagine, BC is obtained from the beginning of the test, but the maximum production is still low and never reaches 2.0 g/L. Peptone or corn steep liquor, in combination with yeast extract, provides the highest yield in BC production, with values around 3.0 g/L at the end of the experiments. However, the P+CSL combination produces a smaller amount of cellulose. These findings clearly establish the need to use

yeast extract in combination with peptone or corn steep liquor to obtain a high BC yield. All these combinations show a similar consumption of fructose. This is consistent with Çoban and Biyik (2011). Tsuchida and Yoshinaga (1997) observed that the presence of lactate in CSL stimulated cell growth and BC production by *G. sucrofermentans*.

BC production always develops at a moderate pH ranging from 5.2 to 6.4, and only the medium with YE+Asn seems to have a rising trend beyond this range (Fig. 6). This could be due to the presence of ammonium from asparagine degradation in the medium.

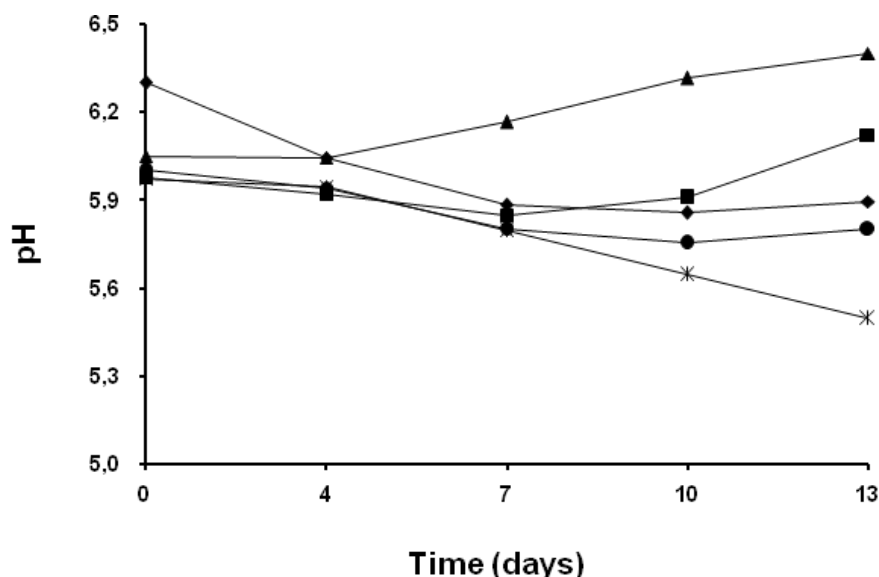


Fig. 6. Nitrogen source selection: Culture media pH. (♦) YE+P, (■) YE+CSL, (▲) YE+Asn, (●) P+CSL, and (×) YE+KNO₃

Regarding the mechanical properties of the BC (Table 2), the burst index is significantly lower with YE+Asn or YE+KNO₃, compared with the rest of the nitrogen sources. For the other three combinations, tested burst strength remains unchanged throughout the experiment, with most values ranging between 4 and 10 kPa m²/g, clearly above those normally found on paper.

The tear strength, as in the study of carbon, shows rather low and scattered values ranging from 2 to 9 mN m²/g; therefore, this variable lacks discriminatory capacity to guide the choice of nitrogen source (Table 2). The optical properties generally stay within the same range of values previously shown when describing the assays of the carbon sources (Table 2).

In view of the above results it was concluded that the most appropriate combinations of nitrogen sources are YE–P and YE–CSL. In the absence of significant differences between these two sources of nitrogen, the effect of ethanol was evaluated on both combinations.

Table 2. Variation of Optical and Mechanical Properties of BC Layers at Different Time Points Depending on the Nitrogen Source Used

Nitrogen Source	Time (Days)	Burst Index (kPa m ² /g)	Tear Index (mN m ² /g)	Opacity (%)	Yellowness (%)
Yeast extract + Peptone	4	4.11	5.44	16.55	12.68
	7	10.5	3.13	18.48	38.57
	10	8.91	2.69	22.16	36.91
	13	8.01	2.11	22.91	46.00
Yeast extract + Asparagine	4	b	9.34	14.76	3.08
	7	4.33	4.37	15.00	20.25
	10	3.23	3.37	14.95	30.27
	13	2.77	2.97	15.00	21.36
Peptone + Corn steep liquor	4	6.64	4.64	19.30	23.63
	7	10.1	3.66	20.32	30.91
	10	10.3	3.25	20.11	34.72
	13	9.04	3.32	18.78	34.53
Yeast extract + Corn steep liquor	4	6.83	4.64	24.48	16.48
	7	11.9	3.49	22.28	33.44
	10	10.8	2.86	25.25	37.05
	13	13.6	2.16	23.47	37.41
Yeast extract + Potassium nitrate	4	a	a	a	a
	7	a	a	a	a
	10	a	a	a	a
	13	6.32	2.52	16.04	26.73

a, BC layer not formed; b, under the sensibility limit

Evaluation of the Effect of Ethanol

As discussed in the Introduction, the addition of 1% ethanol has been shown to increase the production of BC (Yunoki *et al.* 2004). Experiments were conducted to see whether this effect was significant for the bacterial strain and conditions. BC production was measured with preselected nitrogen sources in the presence and absence of 1% ethanol. With regard to fructose consumption (Fig. 7), the addition of ethanol to the media resulted in slightly lower figures. This effect has been reported previously by Park *et al.* (2003) and by Yunoki *et al.* (2004). Nevertheless, these authors found an increase in BC production in the presence of ethanol from the beginning of the test, whereas in this study's tests with the addition of 1% ethanol to the culture media BC production increased only in the last part of the assay in which YE+CSL was used as the nitrogen source (Fig. 8).

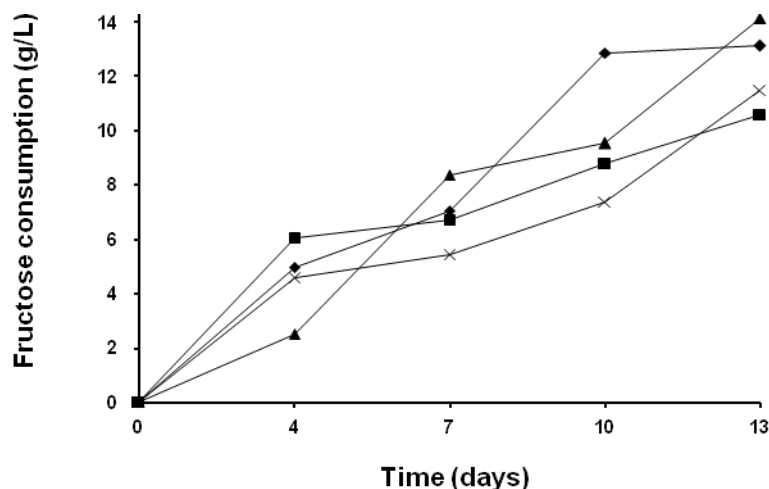


Fig. 7. Effect of ethanol: Fructose consumption. (♦) YE+P, (■) YE+P(EtOH), (▲) YE+CSL, and (×) YE+CSL(EtOH)

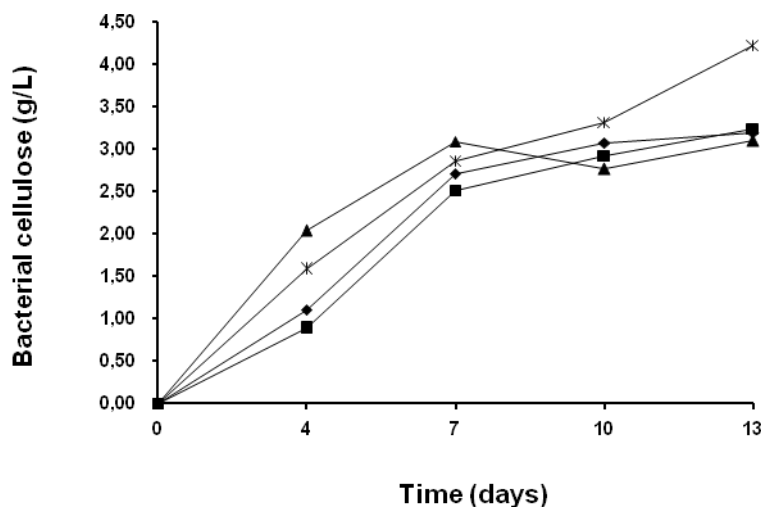


Fig. 8. Effect of ethanol: BC production. (♦) YE+P, (■) YE+P(EtOH), (▲) YE+CSL, and (×) YE+CSL(EtOH)

Both with YE+CSL and YE+P, the addition of ethanol lowered the pH (Fig. 9) more than two points on day 4. In light of what has been discussed above, the increase in the production of BC achieved with the addition of ethanol to the YE+CSL medium can only be useful if bacterial cellulose is not generated directly on the document to be restored. Using *A. xylinum* ATCC 10245, Yunoki *et al.* (2004) observed no differences in pH due to the presence of ethanol for 7 days. However, Park *et al.* (2003) used *G. hansenii* and found a decrease in pH to 3 units on day 5.

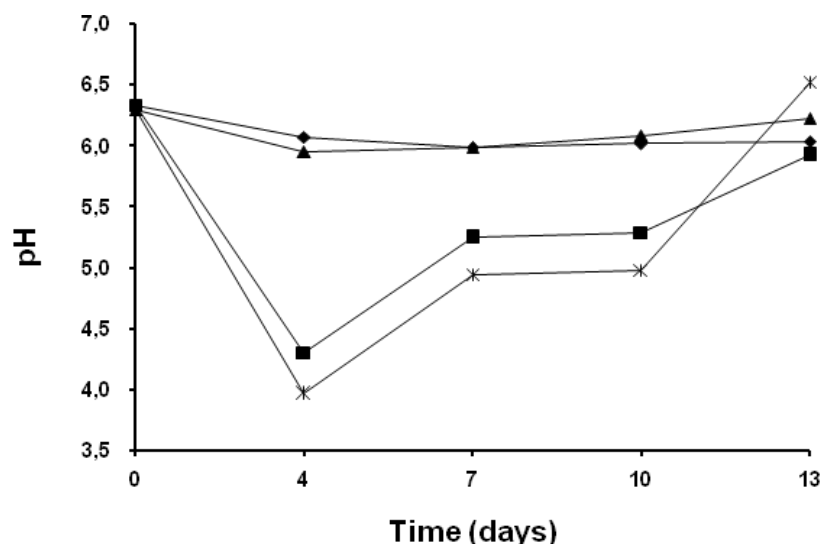


Fig. 9. Effect of ethanol: Culture media pH. (♦) YE+P, (■) YE+P(EtOH), (▲) YE+CSL, and (×) YE+CSL(EtOH)

Regarding the effect of ethanol on optical and mechanical properties (data not shown), the burst index values are similar and high in all cases, although the combination YE+CSL in the absence of ethanol provides a slightly more resistant bacterial cellulose. If the BC is going to be formed directly on the paper, YE+CSL in the absence of ethanol will be the selected culture medium as it yields a slightly more resistant bacterial cellulose and the tear strength and optical properties show no significant differences.

CONCLUSIONS

1. This study demonstrates the feasibility of using bacterial cellulose in the restoration of degraded documents.
2. Bacterial cellulose has high burst strength, acceptable tear strength, and good optical properties. In particular, cellulose produced by *G. sucrofermentans* CECT 7291 is suitable if fructose is used as the carbon source.
3. Yeast extract with corn steep is selected as the nitrogen source, without the addition of ethanol to the growth media if cellulose is to be generated directly on the paper, and with the addition of ethanol if BC is applied for reinforcement after it is formed and washed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via Project CTQ 2010-17702.

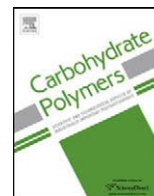
REFERENCES CITED

- Basta, A. H., and El-Saied, H. (2009). "Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper," *J. Appl. Microbiol.* 107, 2098-2107.
- Brett, C. T. (2000). "Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition and integration into the cell wall," *Int. Rev. Cytol.* 199, 161-199.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., and Singhal, R. S. (2009). "Microbial cellulose: Fermentative production and applications," *Food Technol. Biotechnol.* 47, 107-124.
- Cleenwerck, I., De Vos, P., and De Vuyst, L. (2010). "Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki *et al.* 1996) sp. nov., comb. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2277-2283.
- Çoban, E. P., and Biyik, H. (2011). "Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5," *Afr. J. Biotechnol.* 10, 5346-5354.
- Colvin, J. R., and Leppard, G. G. (1977). "The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*," *Can. J. Microbiol.* 23, 701-709.
- Czaja, W., Romanowicz, D., and Brown, R. M. Jr. (2004). "Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture," *Cellulose* 11, 403-411.
- Gao, W.-H., Chen, K.-F., Yang, R.-D., Yang, F., and Han, W.-J. (2011). "Properties of bacterial cellulose and its influence on the physical properties of paper," *BioResources* 6, 144-153.
- Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., and Peijs, T. (2011). "Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process," *Biores. Technol.*, 102, 9105-9110.
- Hestrin, S., and Schramm, M. (1954). "Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose," *Biochem. J.* 58, 345-352.
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., and Kim, Y. S. (1999). "Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture," *J. Biosci. Bioeng.* 88, 183-188.
- Jonas, R., and Farah, L. F. (1998). "Production and application of bacterial cellulose," *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 101-106.
- Kai, A., and Keshk, S. M. A. S. (1999). "Structure of nascent microbial cellulose VI. Influence of positions of sulfonate groups in fluorescent brightener on crystal structure of microbial cellulose," *Polymer J.* 31, 61-65.
- Keshk, S. M. A. S., and Sameshima, K. (2005). "Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production," *Afr. J. Biotechnol.* 4, 478-482.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., and Swings, J. (2006). "The family *Acetobacteraceae*: The genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*," In: *The Prokaryotes*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.), Springer-Verlag, New York, 163-200.

- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., and Gidley, M. J. (2009). "Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC53524," *J. Appl. Microbiol.* 107, 576-583.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., and Yoshinaga, F. (1998). "Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture," *J. Ferment. Bioeng.* 85, 598-603.
- Okamoto, T., Yamano, S., Ikeaga, H., and Nakamura, K. (1994). "Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 563-568.
- Park, J. K., Jung, J. Y., and Park, Y. H. (2003). "Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol," *Biotechnol. Lett.* 25, 2055-2059.
- Pourramezan, G. Z., Roayaei, A. M., and Qezelbash, Q. R. (2009). "Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2," *Biotechnology* 8, 150-154.
- Ramana, K. V., Tomar, A., and Singh, L. (2000). "Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*," *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 245-248.
- Rani, M. U., and Appaiah, A. (2011). "Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09," *Ann. Microbiol.* 61, 781-787.
- Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M. (1991). "Cellulose biosynthesis and function in bacteria," *Microbiol. Rev.* 55, 35-38.
- Shoda, M., and Sugano, Y. (2005). "Recent advances in bacterial cellulose production," *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10, 1-8.
- Smook, G. A. (1990). *Handbook for Pulp and Paper Technologists*, TAPPI Press, Atlanta.
- Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G., and Lee, S.-J. (2001). "Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures," *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33, 1-5.
- Surma-Ślusarska, B., Danielewicz, D., and Presler, S. (2008). "Properties of composites of unbeaten birch and pine sulphate pulps with bacterial cellulose," *Fibres and textiles in Eastern Europe* 16, 127-129.
- Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. (1995). "Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture," *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 59, 1498-1502.
- Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. (1997). "Production of bacterial cellulose by agitation culture systems," *Pure Appl. Chem.* 69, 2453-2458.
- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., and De Wulf, P. (1998). "Improved production of bacterial cellulose and its application potential," *Polym. Degrad. Stability* 59, 93-99.
- Velasco-Bedrán, H., and López-Isunza, F. (2007). "The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes," *Process Biochem.* 42, 1180-1190.
- Williams, W. S., and Cannon, R. E. (1989). "Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*," *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2448-2452.

- Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T. (1997). "The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S Ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level," *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1244-1251.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y., and Uryu, M. (1989). "The structure and mechanical properties of sheet prepared from bacterial cellulose," *J. Mater. Sci.* 24, 3141-3145.
- Yamanaka, S., Ishihara, M., and Sugiyama, J. (2000). "Structural modification of bacterial cellulose," *Cellulose* 7, 213-225.
- Yunoki, S., Osada, Y., Kono, H., and Takai, M. (2004). "Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: Analysis using ¹³C-labeled carbon sources," *Food Sci. Technol. Research* 10, 307-313.

Article submitted: March 7, 2013; Peer review completed: April 23, 2013; Revised version accepted: May 21, 2013; Published: May 23, 2013.



Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration



Sara M. Santos^{a,*}, José M. Carbajo^a, Ester Quintana^a, David Ibarra^a, Nuria Gomez^a, Miguel Ladero^b, M. Eugenia Eugenio^a, Juan C. Villar^a

^a Laboratory of Cellulose and Paper, INIA, Forest Research Center, Spain

^b Department of Chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 November 2013

Received in revised form 19 February 2014

Accepted 26 March 2014

Available online 3 April 2014

Keywords:

Bacterial cellulose

Characterization

Purification

Paper restoration

Aging

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) synthesized by *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 seems to be a good option for the restoration of degraded paper. In this work BC layers are cultivated and purified by two different methods: an alkaline treatment when the culture media contains ethanol and a thermal treatment if the media is free from ethanol. The main goal of these tests was the characterization of BC layers measured in terms of tear and burst indexes, optical properties, SEM, X-ray diffraction, FTIR, degree of polymerization, static and dynamic contact angles, and mercury intrusion porosimetry. The BC layers were also evaluated in the same terms after an aging treatment. Results showed that BC has got high crystallinity index, low internal porosity, good mechanical properties and high stability over time, especially when purified by the alkaline treatment. These features make BC an adequate candidate for degraded paper reinforcement.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cellulose is the most abundant polysaccharide in nature. It is synthesized by plants, some animals and a large number of microorganisms (Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska, 2005). *Gluconacetobacter sucrofermentans* (previously *Gluconacetobacter xylinus*) is a gram-negative bacterium, strictly aerobic, that produces cellulose from different carbon sources (Ramana, Tomar, & Singh, 2000) at temperatures ranging between 25 and 30 °C and pHs varying from 3 to 7 (Bielecki et al., 2005; Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000). Cellulose is a primary metabolic product of these bacteria and plays an important role in keeping them in contact with the oxygen-rich surface, protecting the cells from ultraviolet light and retaining moisture (Klemm, Shuman, Udhardt, & Marsch, 2001).

Bacterial cellulose (BC) synthesis occurs as a multi-step series of chemical reactions beginning with the incorporation of monomeric glucose into β -1,4-glucan chains (Jonas & Farah, 1998) that aggre-

gate into subfibrils, which then are extruded through pores arranged on the cell surface. Approximately 10–100 subfibrils entangle together to form crystalline microfibrils of around 3.5 nm in diameter (Jonas & Farah, 1998). Subsequently, these microfibrils are gathered in bundles, which group to form ribbons (Yamanaka, Ishihara, & Sugiyama, 2000). Ribbons intertwine with ribbons from other bacterial cells, forming a two-dimensional layer. Finally, parallel layers interact with one another by hydrogen bonds and Van der Waals forces, generating a gelatinous suspension or pellicle, in the liquid medium (Brett, 2000). Water absorbed by the BC layers can be removed, leaving chemical groups available for new hydrogen bonds between adjacent cellulose chains, a process that increases crystallinity (Colvin & Leppard, 1977).

BC is chemically identical to that produced by plants, but it is organized in a different macrostructure. BC shows higher crystallinity (Nakagaito, Nogi, & Yano, 2010), mechanical strength and purity (Castro et al., 2011), because it is free from lignin, hemicellulose and other biopolymers and extractives typical of the vegetal cell wall. On account of its unique properties, BC has multiple applications in fields as diverse as paper, textile and food industries, also as a biomaterial for manufacturing cosmetics, artificial skin, artificial blood vessels or high fidelity speakers (Chawla, Bajaj, Survase, & Singhal, 2009).

BC's properties and possible uses are highly dependent on its structure. Therefore, this paper reports on the morphology and structure of optimal BC pellicles produced by *G. sucrofermentans*

* Corresponding author at: Laboratory of Cellulose and Paper, INIA, Forest Research Center, Ctra. de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913476834; fax: +34 913476767.

E-mail addresses: santos@inia.es (S.M. Santos), chema@inia.es (J.M. Carbajo), quintana.ester@inia.es (E. Quintana), ibarra.david@inia.es (D. Ibarra), nuria@inia.es (N. Gomez), mladerog@ucm.es (M. Ladero), mariaeugenia@inia.es (M.E. Eugenio), villar@inia.es (J.C. Villar).

CECT 7291, in order to increase the knowledge on its future application in paper restoration. Culture media were previously optimized for this application, selecting fructose and CSL-yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively (Santos, Carbajo, & Villar, 2013).

Two methods of paper restoration with BC could be used: (1) separate production of BC layers to be subsequently applied over the document that is to be restored; and (2) direct generation of BC on the surface of the document. Although the addition of 1% ethanol has been reported to improve BC production (Yunoki, Osada, Kono, & Takai, 2004), this results in a significantly lower pH (Santos et al., 2013), which is a major disadvantage for method (2) because the document may be damaged, but not for method (1) because the layer is washed before its application on the paper getting an adequate pH. So, in order to study this possibility also, here, half the BC samples were cultivated on fructose and CSL-yeast extract adding 1% ethanol to the culture medium.

Regardless of the presence or absence of ethanol, a purification step has to be added to remove bacteria and the culture medium from the BC before its future application to paper. Previously, several assays for killing bacteria were tested and two options were selected: If BC is going to be applied as described in method (1), the purification was achieved with an alkaline treatment, a standard procedure to remove bacteria and the culture medium. However, this alkaline treatment could adversely affect the document if BC is going to be generated directly on its surface, that is to say, in method (2). In this case, to prevent damage to the document, a gentler thermal treatment was used. Afterwards, an aging process was applied in both cases to evaluate the BC performance over time, with characterization being conducted before and after aging.

BC samples were characterized in terms of their mechanical properties (tear and burst strength), optical properties, surface properties (static contact angles), porosity (Hg intrusion porosimetry), crystallinity (SEM, X-ray diffraction), and FTIR response. Mechanical, optical and surface properties, as well as porosity, are parameters of interest in papermaking and they will determine the use and durability of BC in paper restoration. Other properties, such as crystallinity and viscosity, relate to the structure and integrity of BC, while the FTIR response has been used to determine the presence of non-cellulosic substances in the samples.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

G. sucofermentans CECT 7291 was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT). For maintenance, it was subcultured periodically in HS medium (Hestrin & Schramm, 1954). *G. sucofermentans* was grown in HS solid medium placed in Petri dishes for 6 days, in order to obtain the suspension of bacterial cells to be used in subsequent experiments. These plates were inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of liquid HS medium and cultivated in static conditions for 4 days. Subsequently, the pellicles formed were cut in small pieces (approx. 1 cm × 1 cm) in sterile conditions and shaken with the liquid medium at 700 rpm for 30 min. The suspension obtained was filtered through gauze, centrifuged at 4000 rpm for 10 min and, after removing the supernatant, the pellet was washed with Ringer's solution (NaCl, 2.5 g/L; KCl, 0.105 g/L; CaCl₂·2H₂O, 0.120 g/L; and NaHCO₃, 0.05 g/L). This solution was centrifuged again in the same conditions and the pellets were re-suspended in a small volume of Ringer's. The optical density of the solution was adjusted to 0.59–0.64 (McFarland standards 3–4), with a wavelength of 600 nm diluting with Ringer's solution. Aliquot parts of 250 µL of this final solution were inoculated into 100 mL of medium.

2.2. Production of cellulose layers

Culture media used for bacterial cellulose production were: (1) a modified HS medium (fructose, 20 g/L; yeast extract, 5 g/L; corn steep liquor, 5 g/L; Na₂HPO₄, 2.7 g/L; and citric acid, 1.15 g/L); and (2) medium of equal composition plus 1% ethanol. In all cases 100 mL of liquid medium were added to 150 mm Petri dishes, which went on to be inoculated with the suspension described above and cultivated at 30 °C under static conditions. Cellulose layers were analyzed after 7 days of cultivation. At least 5 different layers were tested for each property.

2.3. Purification of cellulose layers

The cellulose pellicles were washed with distilled water. Pellicles grown in ethanol containing medium were incubated at 90 °C in 1% NaOH for 60 min (Ethanol-BC-Alkaline Treatment: E-BC-AT). Pellicles produced in ethanol free medium were kept at 65 °C for 24 h (no Ethanol-BC-Thermal Treatment: nE-BC-TT). Pellicles were exhaustively washed under a continuous distilled water flow after both treatments. To measure the isolated effect of purification on BC, non-treated samples were only exposed to washing with continuous distilled water (Ethanol-BC: E-BC and no Ethanol-BC: nE-BC). Finally, cellulose films were dried by filtering through medium porosity filter paper in a Buchner funnel plus air drying.

2.4. Aging of cellulose layers

BC layers were submitted to an accelerated aging process at 80 °C and 65% relative humidity, for 144 h; according to ISO 5630-3:1996. Prior to their characterization, aged and not aged dry films were conditioned under standard conditions (23 °C and 50% relative humidity), according to ISO 187:1990.

2.5. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

A Jasco FTIR-4600 spectrophotometer, equipped with an accessory single reflection diamond, was used to perform the analysis. Resolution of the spectrophotometer was set at 2 cm⁻¹, and 100 scans were obtained in the 4000–650 cm⁻¹ spectral region.

2.6. X-ray diffraction (XRD)

Bacterial cellulose crystallinity was studied by XRD using a multipurpose PAN analytical diffractometer, model X'Pert MPD. This diffractometer is equipped with a copper X-ray tube and two goniometers with vertical configuration θ-2θ and Bragg–Brentano optic. One of the goniometers has a multipurpose sample support, which can hold large samples as heavy as 1 kg and measuring up to 10 cm × 10 cm × 10 cm. The supporting platform of the second goniometer is a sample spinner fitted with an automatic sampler with 21 positions. The diffractometer is used in phase analysis and, in this study, the angular range between 2θ = 5–40° was studied.

The crystallinity indexes for the BC samples have been calculated in each case using the equation (Retegi et al., 2010):

$$\text{Crystallinity (\%)} = \frac{I_{200} - I_{2\theta=18^\circ}}{I_{200}}$$

2.7. Viscosity

The limiting viscosity number has been determined after dissolving BC in cupriethylenediamine, according to ISO 5351:2010. The only variation in our study was that BC was dissolved directly

in diluted cupriethylenediamine solution, without previously disintegrating it in water.

2.8. Mercury intrusion porosimetry

Pore structure of the cellulose layers was assessed by the mercury intrusion test, using a 9320 Porosizer from Micromeritics. This technique consists in forcing mercury into the sample pores at increasing pressures (from 3.5 MPa to 227,000 MPa). The output data is the volume of mercury intruded into the sample as a function of the pressure applied, which is inversely proportional to the size of the pores. To provide a curve of the pore size distribution, the differential volumes of mercury imbibed at a given pressure were plotted versus the mean pore diameter. The volume of cellulose pores within a specific diameter range is proportional to the area under this curve.

2.9. Static and dynamic contact angle

The static contact angle measurements were performed in a Data Physics Instrument OCA 15 plus, running on SCA 20/21 software and using the sessile drop method. The images were taken by a CCD camera immediately after the drop landed on the surface of the cellulose layer. The corresponding contact angle is calculated after fitting the drop contour line numerically, using the Young–Laplace method. In this study, 20 drop tests were conducted with distilled water drops of 2 μ L.

Dynamic wettability was assessed monitoring the change over time of the contact angle with water. The same automated contact angle tester was used. For each sample, five videos recorded the evolution of the drop during 60 s, taking one frame per second, applying droplets of 2 μ L. In order to quantify differences in the evolution of the contact angles (α), the wettability rate for each sample was calculated as follows:

$$\text{Wettability rate} = \frac{(\alpha_t - \alpha_5)}{(t - 5)}$$

where t is 60 s. As droplets only become stable after the first 5 s, this time interval is subtracted.

2.10. Scanning electron microscopy

The morphology of the BC layers was studied by SEM microscopy using a JEOL JSM 6335F at 1 kV (with maximum resolution of 5 nm) to avoid energetic degradation of the samples during SEM observation. Such samples were metalized with gold during 3 min and stored for 16–18 h at 50 °C in a vacuum stove (20 mmHg) before proceeding with the SEM observations. This latter treatment led to total dryness of the samples.

2.11. Mechanical and optical properties

The following mechanical properties were determined: Grammage (ISO 536:2012), burst strength (ISO 2759:2001) and tear strength (ISO 1974:2012). A Color Touch reflectometer (Datacolor®) was used to assess the optical properties: ISO brightness (ISO 2470-1:2009), opacity (ISO 2471:2008) and yellowness index (SCAN-G 5:03). Yellowness is defined as the attribute by which an object color is judged to depart from a preferred white toward yellow.

3. Results and discussion

A previous study has assessed the efficiency of the purification methods described above (thermal and alkaline) by inoculating HS

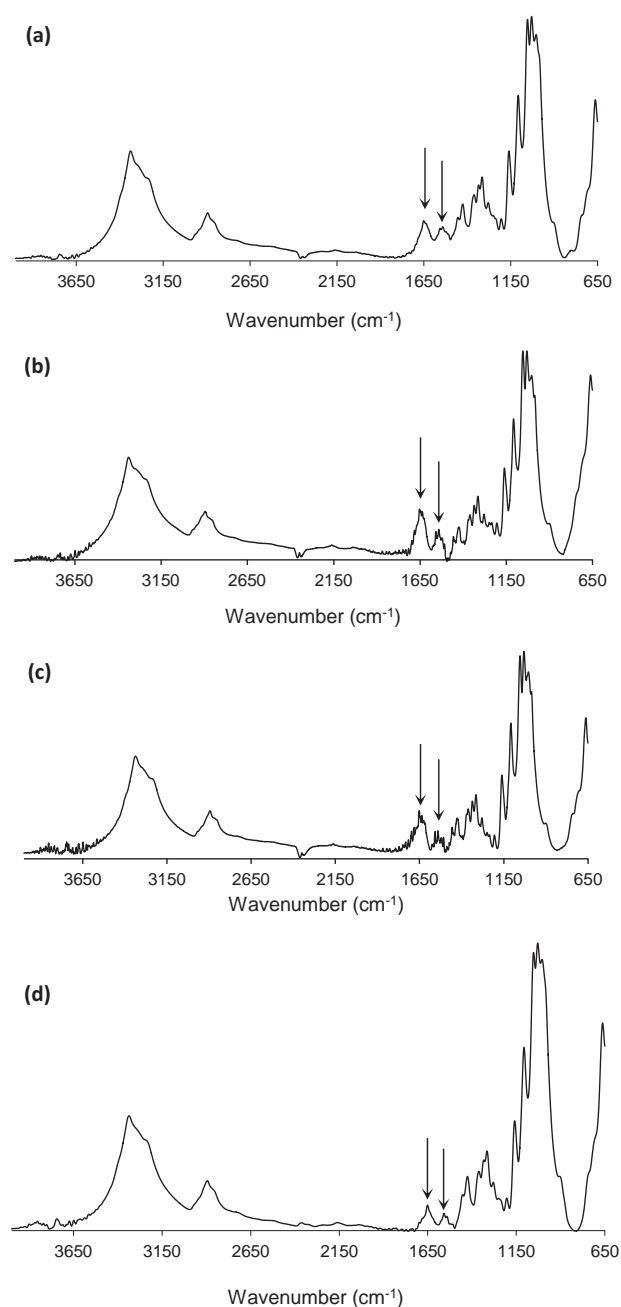


Fig. 1. FTIR spectroscopy of non-aged cellulose layers. (a) nE-BC, (b) E-BC, (c) nE-BC-TT, (d) E-BC-AT.

Petri dishes with pieces of treated and untreated BC. *G. sucrofermentans* only grew in dishes that had untreated BC, which proved that these methods kill the bacteria efficiently.

3.1. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR spectroscopy enables to evaluate the efficiency of the purification method and the structure of the cellulose layers by observing the resulting absorption bands. Fig. 1 shows the typical bands of cellulose in FTIR spectra (C–O bonds at 1055, C–H bonds at 2900, and O–H bonds at 3340 cm^{-1}). Sugiyama, Persson, and Chanzy (1991) have reported that signals near 750 and 3240 indicate the existence of type I α crystalline cellulose, and signals near 710 and 3270 are indicative of type I β (Fig. 1); therefore, both polymorphisms are present in BC.

According to [Duvey and Saxena \(2002\)](#), the two peaking signals approximately at 1536 and 1640 cm^{-1} correspond to the amide bond and can be associated with proteins and residual biomass, that is, biological impurities likely originated from the bacteria or compounds in the culture medium that may have remained attached to the cellulose layers. It can be observed ([Fig. 1a and b](#)) that cellulose layers generated in the presence of 1% ethanol (E-BC) result in higher bands than those from samples produced without ethanol (nE-BC). The reason behind this finding may be that ethanol would promote the development of bacteria and result in more byproducts, such as organic acids ([Li et al., 2012](#)).

The amount of impurities does not change when the treatment used to kill the bacteria was the thermal treatment; nE-BC-TT compared with nE-BC ([Fig. 1a and c](#)). However, with the alkaline purification treatment (E-BC-AT) the two peaking bands were much lower than those of E-BC ([Fig. 1b and d](#)). Hence, it can be inferred that even though a treatment at 65 °C kills bacteria, it does not eradicate them. In contrast, the NaOH treatment does eradicate the bacteria by cell lysis ([Barud et al., 2008](#)) and chemical bond breakage.

When the aging process is applied, the FTIR spectrum of the BC layers (data not shown) shows no significant differences with results obtained before the aging process. Thus, it can be concluded that the aging process does not disrupt the structure of BC nor alters the efficiency of the purification methods. This stability supports the feasibility of using BC in paper restoration.

3.2. X-ray diffraction (XRD)

[Fig. 2](#) shows the results from XRD for the four samples of non-aged ([Fig. 2A](#)) and aged bacterial cellulose ([Fig. 2B](#)). Each of these has two diffraction dominant peaks, the first one located between 13° and 16° and the second one located between 21° and 25°. Each peak presents both the crystalline phase I α and I β . [Barud et al. \(2008\)](#) investigated the composite membranes of BC and suggested that the first peak represents the projection of the planes (1 0 0) of fraction I α and (1 1 0 and 0 1 0) of fraction I β , and the second peak represents the projection of the planes (1 1 0) I α and (2 0 0) I β .

The crystallinity indexes ([Table 1](#)) are higher than those obtained with vegetal cellulose pulps. Typical values are 74.9% for *Eucalyptus grandis* pulp and 75.5% for *Pinus taeda* pulp ([Poletto, Pistor, Zeni, & Zattera, 2011](#)).

[Cheng, Catchmark, and Demirci \(2009\)](#) obtained similar crystallinity indexes using the same strain to study the influence of additives in BC production. It can be observed that the most crystalline layers are produced with the alkaline treatment (E-BC-AT), probably because NaOH can solubilize amorphous cellulose and because the alkaline treatment removes proteins and nucleic acids of the bacterial cells ([George, Ramana, Sabapathy, Jagannath, & Bawa, 2005](#)), which increases the crystallinity of the material. The crystallinity increases with aging, which may be to the result of

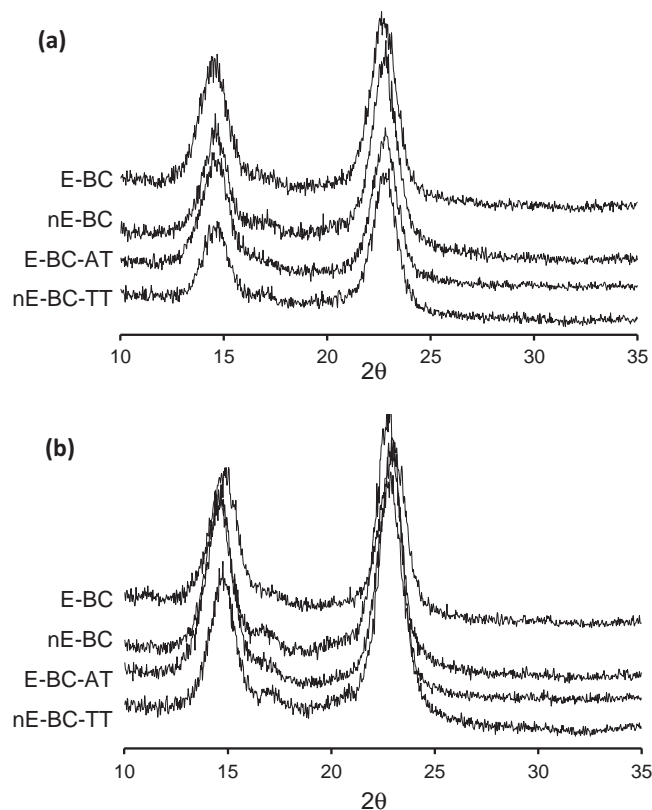


Fig. 2. X-ray diffraction patterns of non-aged (a) and aged (b) BC samples.

metabolites getting leached by the combined effect of temperature and humidity.

3.3. Viscosity

Intrinsic viscosity gives an estimation of the average degree of polymerization of the cellulose, and indicates the relative integrity of cellulose fibers. Viscosity of vegetal cellulose pulp for paper production usually varies from 550 to 950 mL/g ([Lapierre, Bouchard, & Berry, 2009](#)). As can be observed in [Table 1](#), viscosity of BC is, in most cases, higher than these values.

The thermal treatment, that facilitates the removal of certain metabolites, increases viscosity. The alkaline treatment promotes a bigger viscosity increment secondary to the marked purification ([George et al., 2005](#)) and the elimination of low molecular weight cellulose ([Jahan, Rawsan, Nasima Chowdhury, & Al-Maruf, 2008](#)). The increment in viscosity produced when the purification method is the alkaline treatment correlates with the crystallinity.

Table 1
Structural properties of BC samples.

	Crystallinity index (%)	Viscosity (mL/g)	Total porosity (%)	Static contact angle (°)	Wettability rate (°/s)
No Ethanol-BC					
Non-aged	83.4	820	66.2	51.5	0.29
Aged	88.6	900	52.4	65.0	0.18
No Ethanol-BC-Thermal Treatment					
Non-aged	83.8	1050	53.3	84.9	0.29
Aged	89.8	830	49.4	76.4	0.15
Ethanol-BC					
Non-aged	86.8	950	56.0	72.3	0.28
Aged	87.2	1030	56.6	76.2	0.16
Ethanol-BC-Alkaline Treatment					
Non-aged	87.7	1700	61.9	41.3	0.21
Aged	90.0	1220	59.3	42.7	0.14

Aging of cellulose layers previously treated causes the degradation of the cellulose chains. However, the slight increase in viscosity observed in non-treated layers after the aging process may be related to the leaching of low molecular weight metabolites due to the high temperature and humidity conditions of aging process. This removal would compensate the effect of cellulose chain degradation which was mentioned before. In treated layers this low molecular weight compounds have been previously removed during the treatments.

3.4. Mercury intrusion porosimetry

Fig. 3 shows curves of pore size distribution for the four samples, before and after the aging process. This technique has been used and broadly discussed for paper sample characterization, but not for BC layers. Several authors have described two types of paper porosity: (a) surface porosity or pores larger than $10\ \mu\text{m}$ mainly placed on the surface of the sheet, and (b) internal porosity or pores with diameters of less than $10\ \mu\text{m}$ (Chinga-Carrasco, Axelsson, Eriksen, & Svensson, 2008; Moura, Ferreira, & Figueiredo, 2005). The present study has used the same criteria in the analysis of bacterial cellulose layers. As it is shown in Fig. 3, the greatest differences are observed in the range of diameters $>10\ \mu\text{m}$. In non-aged samples, nE-BC layers have got the greatest surface porosity, while E-BC layers have a smaller pore fraction.

Table 1 shows the total porosity of the BC layers. The thermal treatment causes a considerable reduction of the total pore volume when compared with nE-BC, while the alkaline treatment results in an increment in the total porosity. A likely explanation for this finding is that NaOH kills and promotes the removal of bacteria, as previously shown by FTIR, and as a consequence, releases the space occupied by the microorganisms and, therefore, increases the pore volume. The high temperature of the aging process causes a diminution of the pore volume, which is consistent with the decrement in porosity caused by the thermal treatment. At high temperatures, water is partially removed from the pores and new bonds are

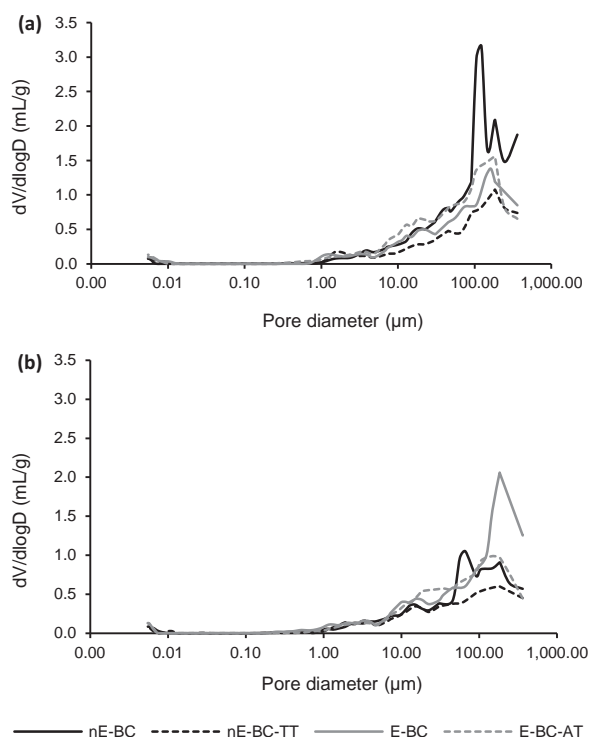


Fig. 3. Pore size distribution for non-aged (a) and aged (b) BC samples.

formed between adjacent cellulose chains, a phenomenon known as hornification (Fernandes Diniz, Gil, & Castro, 2004).

3.5. Static and dynamic contact angles

To know how the BC layers surfaces behave against liquids, static and dynamic contact angles are determined. These measurements

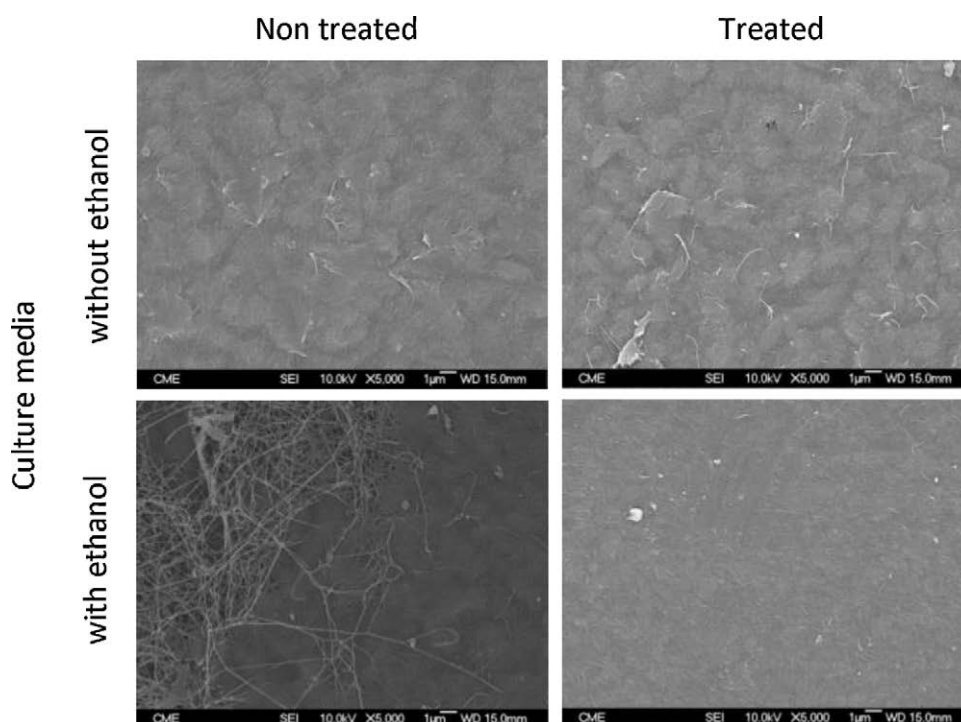


Fig. 4. SEM images of the surfaces of BC layers.

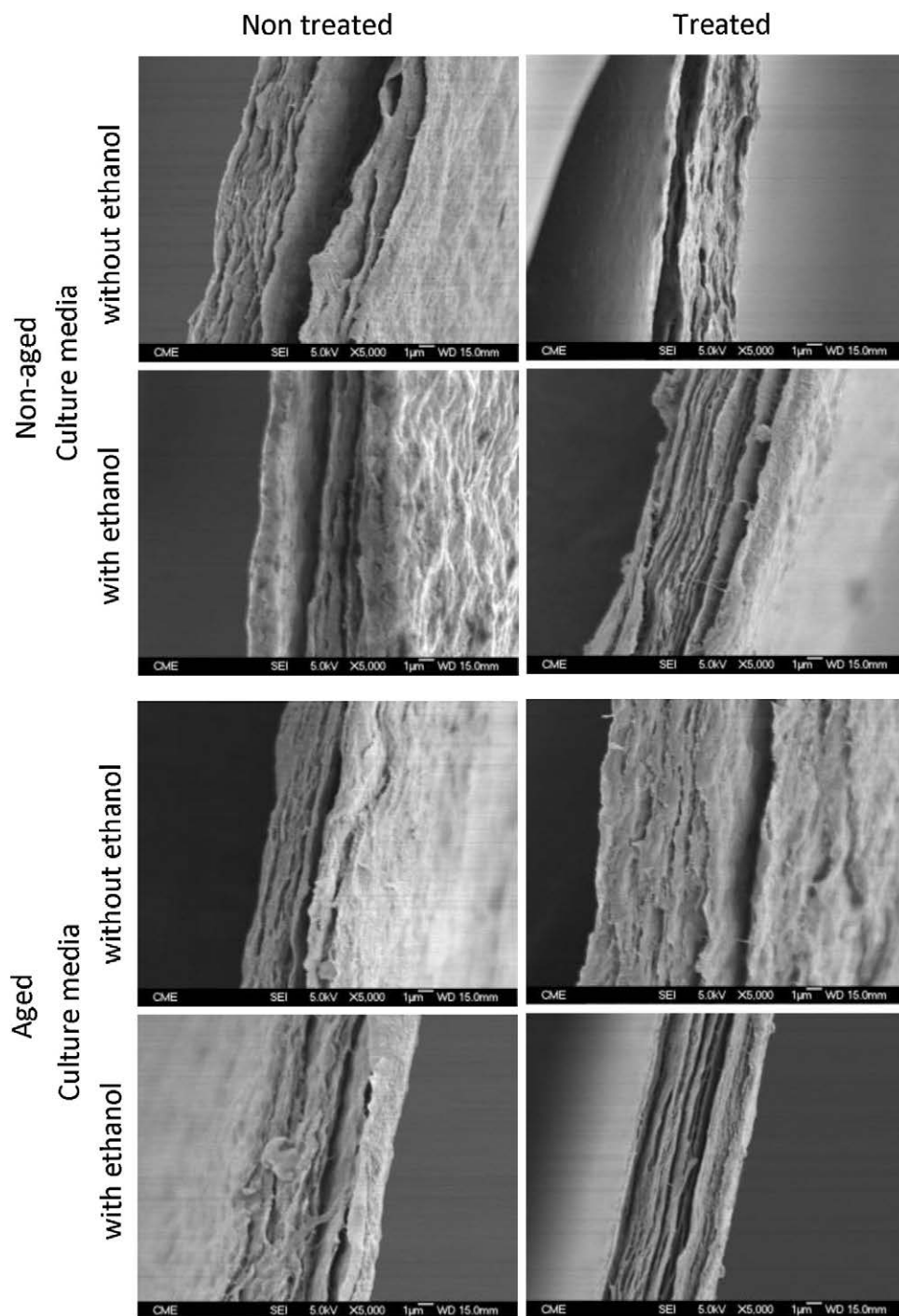


Fig. 5. SEM images of the transversal sections of BC layers.

are widely used to characterize paper printing process, but they have never been used to characterize bacterial cellulose.

The static contact angles with water (α) for the eight samples are listed in Table 1. When comparing the layers without treatments, it becomes evident that angles are greater in the E-BC layers than in nE-BC layers, which might be the result of ethanol contributing to generate a cellulose layer with a certain surface hydrophobicity.

The comparison of the layers without treatments with their respective treated layers shows that the nE-BC-TT sample gets a higher α value than the nE-BC sample, which may be a result of the purification process removing certain polar metabolites and

causing hydrophobicity. However, this trend is not consistent with what is observed in E-BC and E-BC-AT layers. Cellulose swelling is a well documented effect of NaOH, and it is responsible for the α decrease (Young, 1994). The results observed with the aged samples clearly show that aging did not change especially the outcome significantly, and this was especially the case of the alkaline treatment, which seems to render very stable cellulose layers.

The wettability rate ($^\circ/s$) is estimated from the dynamic contact angle. All measured rates were rather low: the droplets were hardly absorbed or spread on the surfaces of the BC layers after sixty seconds. The wettability rates get even lower after the aging

Table 2
Optical properties of BC samples.

	Yellowness (%)	Opacity (%)	Brightness (%)
No Ethanol-BC			
Non-aged	21.4	18.6	45.6
Aged	40.2	21.1	34.8
No Ethanol-BC-Thermal Treatment			
Non-aged	28.4	21.8	41.2
Aged	43.3	26.1	32.6
Ethanol-BC			
Non-aged	26.8	24.5	42.8
Aged	35.0	25.1	38.5
Ethanol-BC-Alkaline Treatment			
Non-aged	−3.5	16.0	66.1
Aged	27.7	20.3	43.0

process, and this may be due to hornification resulting in a decrease in porosity with aging, as capillarity phenomena play an important role in wettability on long-time scales. This is an interesting point to bear in mind because preventing water absorption could be positive to restored papers.

3.6. Scanning electron microscopy

The superficial morphology of BC dried layers is shown in the SEM micrographs (Fig. 4), where the ultrafine network of cellulose nanofibres can be observed. It can be clearly noticed that the thermal treatment does not remove the bacterial cells from the layer. In contrast, no bacterial cells are observed after the alkaline treatment. The SEM micrographs of the aged samples (not shown) allowed us to conclude that aging produces no change on the surface.

Fig. 5 shows the SEM micrographs corresponding to the transversal sections of the sheets, before and after aging. The decrement of porosity in the nE-BC-TT samples may be observed. In all cases, aging leads to compaction of the bacterial cellulose sheet, which is consistent with the decrement of porosity and increment of crystallinity index previously described.

High temperatures also decrease the distance between layers in every BC sheet, which is consistent with the results of the thermal treatment and with the assessment of total porosity (Table 1) which have been discussed before.

3.7. Mechanical and optical properties

As it is shown in Fig. 6, with the exception of alkali-treated layers (E-BC-AT), the grammage (Fig. 6a) is similar across all cases. The alkaline treatment lyses cell walls, and this facilitates the removal of the bacteria, as well as short chain cellulose, metabolites and other impurities, which leads to a decrease in basis weight of about 36%. This is consistent with the values reported by George et al. (2005), as they found a decrement in the grammage of about 15–20% when the treating with 0.2 N NaOH. Slight grammage changes observed with aging may be attributed to the samples reaching moisture equilibrium with different degrees of humidity (Hotle, Considine, Wald, Rowlands, & Turner, 2008).

As it can be observed in Fig. 6b and c, BC has high burst strength and acceptable tear strength to use it in paper restoration. In the non-treated samples, there were no significant differences between burst indexes before aging; likewise, the tear index was quite uniform across non-treated non-aged samples. Purification produced by the alkaline treatment results in a significant increase in the tear strength (Fig. 6c) that is consistent with the remarkable increase in viscosity described above, but which also causes a slight decrease of burst strength (Fig. 6b). Aging process does not necessarily produce a detriment in mechanical properties, even in some cases can improve them due to cellulose crosslinking (Zervos, 2010). In

our case, aging process causes no significant differences in the tear index, just a decrease in the E-BC-AT samples. But there is an important decrease in the burst index in nE-BC-TT and E-BC samples, which nevertheless remain higher than values measured in vegetal cellulose paper.

Optical properties are shown in Table 2. When comparing the two non-treated samples, the E-BC layers have got higher

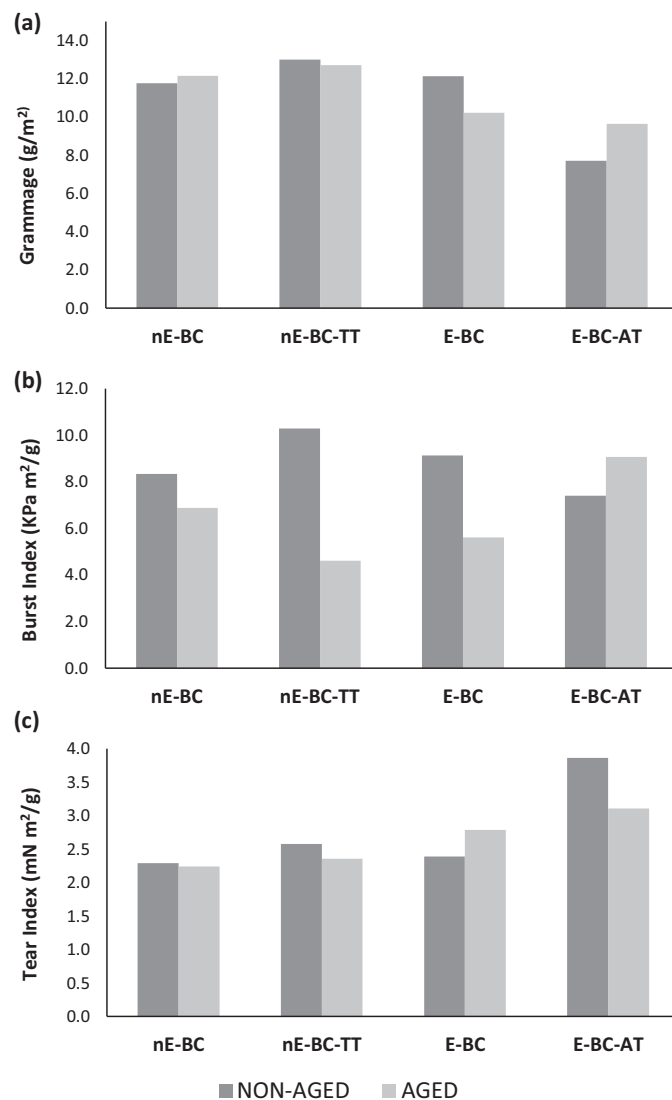


Fig. 6. Mechanical properties of BC samples. (a) Grammage, (b) Burst Index, (c) Tear Index.

yellowness and opacity, and slightly lower brightness. These findings can be attributed to the presence of a higher number of bacterial cells and, also, other metabolites caused by the presence of ethanol in the culture medium (Li et al., 2012).

The thermal treatment results in an increase in yellowness and a decrease in brightness which is common when cellulose undergoes a thermal aging process (Ardelean, Bobu, Niculescu, & Groza, 2011). Alkaline treatment causes a significant decrease in yellowness and an important increment in brightness, consistent with the above discussion as this treatment produces a significant purification of the cellulose layers. Also, this treatment causes a significant decrease in opacity, which, in addition to the elimination of numerous metabolites and cells, may be associated to the significant decrease in basis weight.

The aging process results in a common outcome across all samples examined: an increase in yellowness and a decrease in brightness (as expected), and an increase in opacity consistent with the compaction of the layers observed in the micrographs, as well as with the decrease of porosity.

4. Conclusions

This study deals with the characterization of BC layers focused on its future use on paper restoration. The way to obtain and purify BC layers depends on their possible enforcement modes: for an intended synthesis on the surface of the document, BC layers are produced in a culture medium free from ethanol and purified with a thermal treatment. For an ex situ production of BC layers to be subsequently applied over the document, they are produced in a culture medium with 1% ethanol and purified with an alkaline treatment. Significant differences were found between these methods. In general it can be concluded that bacterial cellulose has high crystallinity index, low internal porosity, and good mechanical properties.

The alkaline treatment promotes an increment in viscosity, crystallinity and purity in the cellulose layers, and eliminates bacterial cells. Remarkable mechanical and optical properties are observed in the cellulose so treated. In contrast, the thermal treatment is less aggressive, rendering layers of similar quality to non-treated ones, although a slight purification occurs that leads to a small improvement in viscosity and mechanical properties.

The BC stability over time was tested by means of an aging process. In view of the results, it may be concluded that aging causes an increment in crystallinity. It also causes a diminution of pore volume. These findings are consistent with those of the thermal treatment. The alkaline treatment provides great stability over time in terms of contact angles, porosity and crystallinity. After the aging process, BC has nearly the same tear index and lower burst index, which nevertheless remains higher than values measured in vegetal cellulose paper.

In both cases (alkaline or thermal treatment) BC may improve the physical properties of the damaged paper and, also, provides stability over time. In thermal treated BC layers, the presence of residual bacterial cells may be an inconvenient and will be tested in future works.

This study suggests that BC could be a promising material for restoration of paper documents because its characteristics and its high stability over time indicate that it can contribute to the reinforcement of degraded paper.

Acknowledgments

The authors wish to thank A. Sánchez Hernampérez, from the National Library of Spain for his invaluable help. The Spanish

Ministry of Science and Innovation funding via Project CTQ 2010-17702 is also acknowledged.

References

- Ardelean, E., Bobu, E., Niculescu, G. H., & Groza, C. (2011). Effects of different consolidation additives on ageing behavior of archived document paper. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45, 97–103.
- Barud, H. S., Assuncao, M. N., Martines, M. A. U., Dexpert-Ghys, J., Marques, R. F. C., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L. (2008). Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 46, 363–367.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., & Kalinowska, H. (2005). Bacterial cellulose. In A. Steinbuchel (Ed.), *Biotechnology of polymer: From synthesis to patents* (pp. 381–434). Munster: Wiley-VCH, Verlag GmbH.
- Brett, C. T. (2000). Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition and integration into the cell wall. *International Review of Cytology*, 199, 161–199.
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caro, G., Mondragon, I., & Gañán, P. (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 84, 96–102.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 107–124.
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2009). Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material properties. *Cellulose*, 16, 1033–1045.
- Chinga-Carrasco, G., Axelsson, M., Eriksen, O., & Svensson, S. (2008). Structural characteristics of pore networks affecting print-through. *Journal of Pulp and Paper Science*, 34, 13–22.
- Colvin, J. R., & Leppard, G. G. (1977). The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 701–709.
- Duvey, V., & Saxena, C. (2002). Pervoration of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 27, 163–171.
- Fernandes Diniz, J. M. B., Gil, M. H., & Castro, J. A. A. M. (2004). Hornification: its origin and interpretation in wood pulps. *Wood Science and Technology*, 37, 489–494.
- George, J., Ramana, K. V., Sabapathy, S. N., Jagannath, J. H., & Bawa, A. S. (2005). Characterization of chemically treated bacteria (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, 189–194.
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58, 345–352.
- Hotle, B. T., Considine, J. M., Wald, M. J., Rowlands, R. E., & Turner, K. T. (2008). Effects of thermal aging on mechanical performance of paper. In K. Kotomäki, K. Koivunen, & H. Paulapuro (Eds.), *Proceedings progress in paper physics seminar 2008* (pp. 315–318). Helsinki: University of Technology, Espoo.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Review: Bacterial cellulose—A masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35, 261–270.
- Jahan, M. S., Rawson, S., Nasima Chowdhury, D. A., & Al-Maruf, A. (2008). Alternative pulping process for producing dissolving pulp from jute. *Bioresources*, 3, 1359–1370.
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of bacterial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 101–106.
- Klemm, D., Shuman, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose—Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26, 1561–1603.
- Lapierre, L., Bouchard, J., & Berry, R. (2009). The relationship found between fiber length and viscosity on three different commercial kraft pulps. *Holzforchung*, 63, 402–407.
- Li, Y., Tian, C., Tian, H., Zhang, J., He, X., Ping, W., & Lei, H. (2012). Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1479–1487.
- Moura, M. J., Ferreira, P. J., & Figueiredo, M. M. (2005). Mercury intrusion porosimetry in pulp and paper technology. *Powder Technology*, 160, 61–66.
- Nakagaito, A. N., Nogi, M., & Yano, H. (2010). Displays from transparent films of natural nanofibers. *MRS Bulletin*, 35, 214–218.
- Poletto, M., Pistor, V., Zeni, M., & Zattera, A. J. (2011). Crystalline properties and the composition kinetics of cellulose fibers in wood pulp obtained by two pulping processes. *Polymer Degradation and Stability*, 96, 679–685.
- Ramana, K. V., Tomar, A., & Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 245–248.
- Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Gañán, P., de la Caba, K., & Mondragon, I. (2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships. *Cellulose*, 17, 661–669.
- Santos, S. M., Carbajo, J. M., & Villar, J. C. (2013). Bacterial cellulose from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 in the restoration of degraded paper: The effect of carbon and nitrogen sources on cellulose production and properties. *Bioresources*, 8, 3630–3645.

- Sugiyama, J., Persson, J., & Chanzy, H. (1991). Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native cellulose. *Macromolecules*, 24, 2461–2466.
- Yamanaka, S., Ishihara, M., & Sugiyama, J. (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, 7, 213–225.
- Young, R. A. (1994). Comparison of the properties of chemical cellulose pulps. *Cellulose*, 1, 107–130.
- Yunoki, S., Osada, Y., Kono, H., & Takai, M. (2004). Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: Analysis using ¹³C-labeled carbon sources. *Food Science and Technology Research*, 10, 307–313.
- Zervos, S. (2010). Natural and accelerated ageing of cellulose and paper: A literature review. In A. Lejeune, & T. Deprez (Eds.), *Cellulose: Structure and properties, derivatives and industrial uses* (pp. 155–204). New York: Nova Science Publishers Inc.

Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration. Part I: application on model papers

Sara M. Santos¹ · José M. Carbajo¹ · Nuria Gómez¹ · Ester Quintana¹ · Miguel Ladero² · Arsenio Sánchez³ · Gary Chinga-Carrasco⁴ · Juan C. Villar¹

Received: 10 July 2015 / Accepted: 1 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The disappearance of bibliographic heritage is one of the biggest problems facing libraries. One of the most common methods used to restore paper, lining, is to apply a reinforcing layer to the document. This study focuses on lining papers with bacterial cellulose (BC) sheets from *Gluconacetobacter sucrofermentans*. For this purpose, several model papers have been selected. They have been characterized before and after the lining with this BC and a specific Japanese paper (JP) to compare both materials. Taking into account the differences between bacterial and vegetal cellulose is expected that the results may be similar to other BC and JP. The samples have been characterized before and after an aging process. There are no significant differences in some of the characteristics studied. Nevertheless, BC-lined papers present higher gloss values and b^* coordinate. The wettability decreases with both BC and JP. However, in papers lined with BC, the wettability decreases more markedly and independently of the model paper used. This is related to the sealing of the surface structure by BC, which also leads to a reduction of air permeability. When the

lined papers go through an aging process, there are no significant changes in any characteristic, except in b^* and L^* color coordinates. Additionally, the wettability rate decreases in all cases. This study indicates that papers lined with BC are stable over time. Finally, the use of BC as reinforcing material may offer advantages for specific conservation treatments, being more suitable for certain types of paper than JP.

Introduction

The most abundant polysaccharide produced in nature, cellulose, can be synthesized by plants, some animals, and a large number of microorganisms [1]. Bacterial cellulose (BC) is mainly produced by *Gluconacetobacter sucrofermentans*, a gram-negative bacterium, strictly aerobic, that produce cellulose as a primary product of its metabolism at temperatures between 25 and 30 °C and pH from 3 to 7 [1, 2], using different carbon sources [3, 4]. BC synthesis

✉ Sara M. Santos
santos@inia.es

José M. Carbajo
chema@inia.es

Nuria Gómez
nuria@inia.es

Ester Quintana
quintana.ester@gmail.com

Miguel Ladero
mladero@quim.ucm.es

Arsenio Sánchez
arsenio.sanchez@bne.es

Gary Chinga-Carrasco
gary.chinga.carrasco@pfi.no

Juan C. Villar
villar@inia.es

¹ Laboratory of Cellulose and Paper, Forest Research Center, INIA, Ctra.de la Coruña km 7,5, 28040 Madrid, Spain

² Department of Chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

³ Restoration Laboratory, Biblioteca Nacional de España, Pº de Recoletos 20-22, 28071 Madrid, Spain

⁴ Paper and Fiber Research Institute (PFI), Høgskoleringen 6b, 7491 Trondheim, Norway

begins with the incorporation of monomeric glucose into β -1,4-glucan chains [5] that aggregate into subfibrils, which form crystalline microfibrils, that subsequently are gathered into bundles, which group to form ribbons [6]. These ribbons interact to form a two-dimensional layer. Finally, parallel layers interact by hydrogen bonds and Van der Waals forces, forming a gelatinous suspension in the liquid medium [7]. Although the BC properties depend on the culture parameters (cultivation method, pH, temperature, carbon, and nitrogen sources) and on the producing strain used, it can be assumed that BC is chemically identical to that produced by plants but shows higher crystallinity [8], mechanical strength, and purity [9], because it is free from lignin, hemicellulose, and other biopolymers and extractives.

Thanks to these structural properties, the BC has a wide field of applications including their use as potential biological substrate for cell culture [10, 11] or in biomedical field, as in the case of artificial skin [5], dialysis membranes [12], tissue regeneration [13], controlled drug delivery [14], and artificial blood vessels [15]. BC has been also used as a reinforcing agent for the design of nanocomposites [16]. For example, BC is able to cover natural fibers when cellulose-producing bacteria are cultivated with them, forming a high number of hydrogen bonds between BC and the natural fibers [17]. Surma-Slusarska et al. [18] studied the possibility of modifying the structure and properties of fibrous papermaking pulps with BC, obtaining specific composites by three ways, i.e., (i) making the BC biosynthesis in the presence of fibers of papermaking semi-products, (ii) adding suitable disintegrated BC film to different papermaking pulps, and (iii) joining semi-product paper sheets with BC film. In all cases, the breaking length was improved. According to the results of these studies, BC may be a promising candidate to be used in paper restoration. However, in spite of the numerous studies dealing with the wide field of applications of BC, to the best of our knowledge, there is no study about this potential use.

Until the nineteenth century, paper was produced with rags of linen, hemp, and cotton [19]. These materials, made mostly by crystalline cellulose of high quality, had a remarkable chemical stability and hardly suffered a significant degradation by hydrolysis or oxidation. However, in the mid-nineteenth century, the demand for paper increased considerably, while the rags were scarce. It was thus necessary to search for a new raw material. In 1840, Köller introduced the use of mechanical pulp from wood that began to be massively used for the production of paper from the 1850s [20]. The fundamental characteristic of the papers made from mechanical wood pulp is the presence of lignin [21], which is degraded by the action of the environment (e.g. ultraviolet radiation, heat). The degradation

of lignin produces radicals and generates acid groups, which cause an acid hydrolysis of cellulose chains. Additionally, Illig developed in 1806 the sizing with rosin, a process that was generalized in the 1840s, replacing gelatin sizing. This process requires an acidic media to be effective [22], which promotes the degradation of the paper. Most importantly, the acidification leads to the disappearance of bibliographic and documentary heritage, which is one of the biggest problems faced by libraries and archives around the world [23].

Paper conservators have attempted to limit the decomposition of paper by adding alkali to neutralize acids and create an alkaline reserve that can buffer future acid degradations [24]. Deacidification does not, however, regain flexibility and strength of the damaged paper; therefore, it is necessary to perform additional treatments for reinforcing the paper [25]. Applying a reinforcing layer to the damaged document is a common method. This method is named “lining” [26]. The material most used to reinforce degraded paper is called “Japanese papers” (JP), which has a low basis weight. JP may be made of different types of Japanese long paper fibers (kozo, mitsumata, gampi...), providing them different properties. However, these types of papers are not completely satisfactory for all the documents to be restored. BC layers may be a good alternative to the JP in the restoration field due to its unique properties (e.g. high purity and crystallinity, and good mechanical properties).

The aim of this study is to evaluate the feasibility of BC to restore documents. BC and JP are characterized in this first part of this study (Part I), as well as the capacity of both materials to be used as reinforcement agents of model papers. For this purpose, BC layers have been obtained by *G. sucrofermentans* using the culture media previously optimized for this application [4]. In order to imitate the papers to be restored, three different model papers have been selected. One of them was filter paper made of cotton, which is totally lignin free and simulates the behavior of a high-quality paper. The other two model papers were handsheets made with wood pulps. One of them is made with 100 % chemical pulp with a residual amount of lignin. The other paper has been made with 100 % mechanical pulp and contains most of the original wood lignin. This model paper simulates the low-quality documents made with wood pulp since 1840. Finally, all of these model papers have been artificially aged to simulate old papers. Both types of samples, original model papers and aged model papers, have been lined with BC and JP.

The characterization of the samples has been made in terms of their mechanical properties (tear and burst strength), optical properties (CIELab coordinates, gloss, opacity), surface wettability (static and dynamic contact angles), and laser profilometry (LP). The way in which the

model papers and the reinforcing material are joined has been studied by scanning electron microscopy (SEM). The properties were determined before and after aging the samples due to the importance of durability of the proposed treatment.

The use of the lined method with BC and its comparative with JP applied to real samples will be discussed in the forthcoming second part (Part II).

Materials and methods

Microorganism

Gluconacetobacter sucrofermentans CECT 7291 was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT). For maintenance, it was subcultured periodically in HS medium [27]. *Gluconacetobacter sucrofermentans* was grown in HS solid medium placed in Petri dishes for 6 days, in order to obtain the suspension of bacterial cells to be used in the further experiments. 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of liquid HS medium were inoculated with these plates and cultivated in static conditions for 4 days. Subsequently, the pellicles formed were cut in small pieces (about 1 cm × 1 cm) in sterile conditions and shaken with the liquid medium at 700 rpm for 30 min. The suspension obtained was filtered through gauze, centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and after removing the supernatant, the pellet was washed with Ringer's solution (NaCl, 2.5 g L⁻¹; KCl, 0.105 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O, 0.120 g L⁻¹; and NaHCO₃, 0.05 g L⁻¹). This solution was centrifuged again in the same conditions, and the pellets were re-suspended in a small volume of Ringer's solution. The optical density of the solution was adjusted to 0.59–0.64 (McFarland standards 3–4) with a wavelength of 600 nm diluting with Ringer's solution. 250 µL of this final solution was used to inoculate 100 mL of medium.

Cellulose layers production and purification

Culture medium used for BC production was a modified HS medium (fructose, 20 g L⁻¹; yeast extract, 5 g L⁻¹; corn steep liquor, 5 g L⁻¹; Na₂HPO₄, 2.7 g L⁻¹; and citric acid, 1.15 g L⁻¹) with 1 % ethanol. In all cases, 100 mL of liquid medium was added to 150-mm Petri dishes, inoculated with the suspension described above and cultivated at 30 °C under static conditions. Cellulose layers were collected after 7 days of cultivation. The cellulose pellicles were washed with distilled water. To purify the BC, the pellicles were incubated at 90 °C in 1 % NaOH for 60 min. After the treatment, the pellicles were exhaustively washed with continuous distilled water and dried by filtering

through a medium porosity filter paper in a Buchner funnel. Subsequently, the cellulose layers were air dried.

Model papers

Filter paper Whatman no 42 (*F*), made from cotton linters, was selected as free lignin, high-quality, model paper. Handsheets from mechanical (*M*) and chemical (*C*) pulps were obtained in a Rapid-Köethen sheet former according to ISO 5269-2:2004. Thirty sheets from each model paper were subjected to an accelerated aging process (filter aged, *F_A*; mechanical aged, *M_A*; chemical aged, *C_A*) according to ISO 5630-3:1996, using 80 °C and 65 % relative humidity during 144 h.

Reinforcement of model papers

Lining is a general term for fusing together thin layers of different materials. In archival contexts, lining refers specifically to the process of layering a sheet of archival paper with stronger materials, in order to strengthen the object. JP and BC were used in this study to evaluate their reinforcing capacity, using native wheat starch as adhesive.

The JP used as reinforcing material, Tengucho (Awagami Papers), was selected because is one of the most common Japanese papers used in restoration (basis weight of 9 g m⁻², white, 100 % kozo fibers, unsized).

Lining was performed following the traditional Japanese method. Previously, wheat starch was prepared in a proportion of 1–3 volumes of water, stirred, and cooked in microwave, stirring every 30 s until boiling 3 times. After cooling 24 h, the starch paste is passed three times through a sieve of horsehair, and then diluted in water three times and bat with a brush and water to achieve the right consistence. The first step of the lining process was to spray with water the model paper, and to apply the starch on the reinforcing material (BC or JP) with a brush. The reinforcing material was then placed on the model paper with a palm fibers brush, also used to smooth the surface and to eliminate possible wrinkles. Afterwards, the reinforced paper was hit with an Uchibake brush to remove bubbles. Finally, it was air dried.

Ten sheets of each model paper (*F*, *M*, *C*, *F_A*, *M_A*, *C_A*) were lined with BC (*F*-BC, *M*-BC, *C*-BC, *F_A*-BC, *M_A*-BC, *C_A*-BC) and ten with JP (*F*-JP, *M*-JP, *C*-JP, *F_A*-JP, *M_A*-JP, *C_A*-JP).

Aging process of lined sheets

Ten lined sheets from each model paper, five reinforced with BC and five with JP, were subjected to an accelerated aging process [(*F*-BC)_A, (*M*-BC)_A, (*C*-BC)_A, (*F_A*-BC)_A, (*M_A*-BC)_A, (*C_A*-BC)_A, (*F*-JP)_A, (*M*-JP)_A, (*C*-JP)_A, (*F_A*-JP)_A,

$(M_A\text{-JP})_A$, $(C_A\text{-JP})_A$] according to ISO 5630-3:1996 using 80 °C and 65 % relative humidity during 144 h. Totally, 24 different samples were characterized.

Paper characterization

The characterization of the aged and non-aged samples was performed before and after the lining. The lined samples were also characterized after the aging process. In all cases, samples were conditioned under standard conditions (23 °C and 50 % relative humidity) according to ISO 187:1990, prior to their characterization.

The mechanical properties determined were as follows: Grammage (ISO 536:2012), burst strength (ISO 2758:2014), and tear strength (ISO 1974:2012). A reflectometer Elrepho 070 was used to obtain optical properties: opacity (ISO 2471:2008) and CIELab coordinates (ISO 5631-1:2009). Specular gloss was determined using an angle of incidence of 75° (ISO 8254-1:1999). To measure the air permeance of the reinforced model papers, a Gurley porosimeter was used (ISO 5636-5:2013).

Static contact angles (α) and dynamic contact angles (α_d) were measured for distilled water with a DataPhysics Instrument OCA 15 plus, running on SCA 20/21 software and using the sessile drop method. For α , the images were taken by a CCD camera immediately after the drop rested on surface. The corresponding contact angle is calculated after fitting the drop contour line numerically, using the Young–Laplace method. In this study, 20 drop tests were conducted, using 2 μL of drop volume. α_d was assessed monitoring the change of the contact angle with distilled water as a function of time. For each sample, eight videos recorded the evolution of the drop for 8 s, taking 25 frames per second, applying droplets of 2 μL . To quantify differences in the evolution of α between samples, wettability rate (W) was calculated as follows:

$$W(\% \text{ s}^{-1}) = (\alpha_0 - \alpha_t) \times 100/t, \quad (1)$$

where α_0 is the corresponding values of normalized α at time 0, α_t is the respective values at a specific time, t , in seconds. In this study, W was calculated at 5 s, since the rates are less affected by errors and reveal more significant differences among the assessed samples.

The morphology of lined sheets was assessed by SEM using a JEOL JSM 6335 F at 1 kV (at a maximum resolution of 5 nm), to avoid upcharging of the samples by the electron beam during SEM observation. Samples have been previously cryofractured after immersing them into liquid nitrogen and metalized with gold during 3 min and stored for 16–18 h at 50 °C in a vacuum stove (20 mmHg) before proceeding with SEM observations. This latter treatment led to total dryness of the samples.

Samples of 10 mm \times 10 mm were coated with a layer of gold for LP analysis (Lehmann, Lehman Mess-Systeme AG, Baden-Dättwil, Germany). Ten LP topography images were acquired from each sample. The lateral and z -resolutions of the LP system were 1 μm and 10 nm, respectively. The size of the local areas was 1 mm \times 1 mm. The surfaces were horizontally leveled. The micro-roughness described by the facet orientation was thus quantified [28].

Results and discussion

Reinforcing materials

Several properties of BC have been evaluated in order to test it as a reinforcing material. These properties have been compared with those of the JP, the most used reinforcing material in paper restoration [26]. As can be shown in Table 1, it is noted that the two materials have a similar grammage; however, the BC sheets are thinner. Materials which are relatively thin and strong, are considered advantageous for restoring documents [29]. With regard to mechanical properties, the burst strength is greater in the BC, while tear strength is significantly higher in the JP.

The Gurley porosimeter data reveal the different macrostructure of the reinforcing materials: PJ is formed by the crosslinking of cellulose vegetal fibers, while BC is formed by a network of cellulose nanofibers [30]. The difference with respect to the Gurley air permeability between both materials is remarkably high, since this property is related to the porosity (structure) of the sheets [31]. However, the air permeability was out of the range of the Gurley air permeability tester. The values for the BC sample were above the upper limit (900 s), indicating a structure that prevents air flow. On the other side, the JP sample exhibited values below the lower limit (5 s), indicating an open structure that does not restrict the air flow.

BC and JP wettability were measured through α with water. As can be seen in Table 1, JP shows a higher α than BC. This difference was as expected, since the measurement of contact angle depends on factors related to the paper structure and to the surface chemistry [32, 33]. As also indicated by the air permeability data, both materials have significantly different structure.

The $L^*a^*b^*$ color Space (CIELab) describes all the colors visible to the human eye. L^* represents the lightness of the color ($L^* = 0$ yields black and $L^* = 100$ indicates white), a^* coordinate gives its position between red/magenta (positive values) and green (negative values), and b^* coordinate stands for its position between yellow (positive values) and blue (negative values) [34]. The determined $L^*a^*b^*$ values are similar for BC and JP. Keep in mind that in most printing papers, L^* values are close to 90 (high

Table 1 BC and JP characterization

	BC	JP
Grammage (g m ⁻²)	7.70	9.04
Thickness (mm)	0.009	0.034
Burst strength (kPa)	57.00	33.00
Tear strength (mN)	29.75	361.50
Air permeance (s)	>900	<5
Static contact angle (°)	72.27	104.01
<i>L</i> *	84.18	88.49
<i>a</i> *	0.23	−0.65
<i>b</i> *	−1.69	1.69
Opacity (%)	16.01	26.10
Gloss (%)	28–36	4–5

lightness), and a^*b^* values are around 0 (almost colorless). In addition, the low opacity implies that the color appearance of the restored documents will not be significantly modified.

The gloss values for JP are in the range of those of uncoated printing papers, whereas gloss values for BC are similar to those of non-glossy coated papers. These different ranges could indicate that each material may be useful to restore different types of papers.

After the aging process, all the properties varied in <10 %, except in the case of b^* , that presents a higher increase in both materials. This indicates an increment in the yellow color intensity, which is a result to the aging process [35].

In view of all these properties, it can be concluded that BC could be appropriate for lining. Although this characterization is specific to the selected BC and JP, it is expected that the results do not differ by much considering other types of BC and JP.

Lined samples

Most of the papers to be restored come from the 1850 to 1950 period. However, in some cases, it may be useful to restore new papers that have suffered deterioration. To simulate both cases, the selected model papers have been submitted to an accelerated aging process. Lining was performed with BC and JP on the non-aged and aged model papers. In both cases, the lined samples were tested before and after being subjected to an additional aging process, to evaluate their stability over time.

The evaluation of mechanical properties of lined samples is essential to determine the goodness of the lining process. Figure 1 shows the burst strength and tear strength, before and after the aging process. When model papers, represented by horizontal lines, are subjected to an aging process, there is

a slight decrease in both mechanical properties. After lining with BC and JP, there is a similar increase in mechanical properties, both in the case of non-aged model papers (Fig. 1a, b) as in aged model papers (Fig. 1c, d). When the lined samples go through an aging process, there is a decrease in the burst strength and tear strength. However, the final values of these properties remain higher than those of the original model papers. Ardelan et al. [25] reported the same behavior with respect to the burst strength after reinforcing aged model papers (105 °C, 72 h) with several additives (e.g. carboxymethylcellulose, methylcellulose, chitosan). The decrease in the mechanical properties is particularly small in the case of samples made from mechanical pulp, M and M_A , which are the most similar to the real papers to be restored due to their low original values. This indicates a good stability over time. It is worth noting that the different mechanical properties of the reinforcing materials (JP higher tear strength, BC higher burst strength) were reduced after lining.

The gloss values of each sample are shown in Table 2. It should be noted that the applied reinforcing material, regardless of the base paper used, determines the resulting paper gloss. The gloss in samples with BC always reaches values between 15 and 25 %. The samples lined with JP are in the range of 4–6 %. With the aging process, the gloss varies <6 points for all assessed samples.

When the papers to restore are matte, as in this study, restoration with a material that is also matte, as JP, do not modify the gloss range of the corresponding samples before lining. However, if the papers to restore have higher gloss (silk or glossy coated papers), lining with BC would be beneficial and lead to gloss values close to those of the original papers.

Opacity of the model papers and lined samples with BC and JP before and after the aging process is shown in Table 3. As expected, M and M_A have higher opacity than the chemical and filter sheets. Neither the lining nor the aging process modifies the opacity of the original M sample. The opacity of chemical and filter sheets, which have lower opacity values before lining, increases slightly with the reinforcing treatment. In these cases, the aging process leads to an additional increment. The same effect has been found by van der Reyden et al. [36] after aging tracing papers. Also Santos et al. [37] described the increase in opacity of BC with aging.

The color coordinates, $L^*a^*b^*$, were determined. a^* values remain in a narrow range close to zero (data not shown). L^* and b^* values are represented in Fig. 2. As expected, when the model papers are aged, L^* decreases and b^* increases, although in all cases, the difference is <5 points. This is consistent with the results previously reported by Bansa and Ishii [26], which studied the effect of aging in different types of papers.

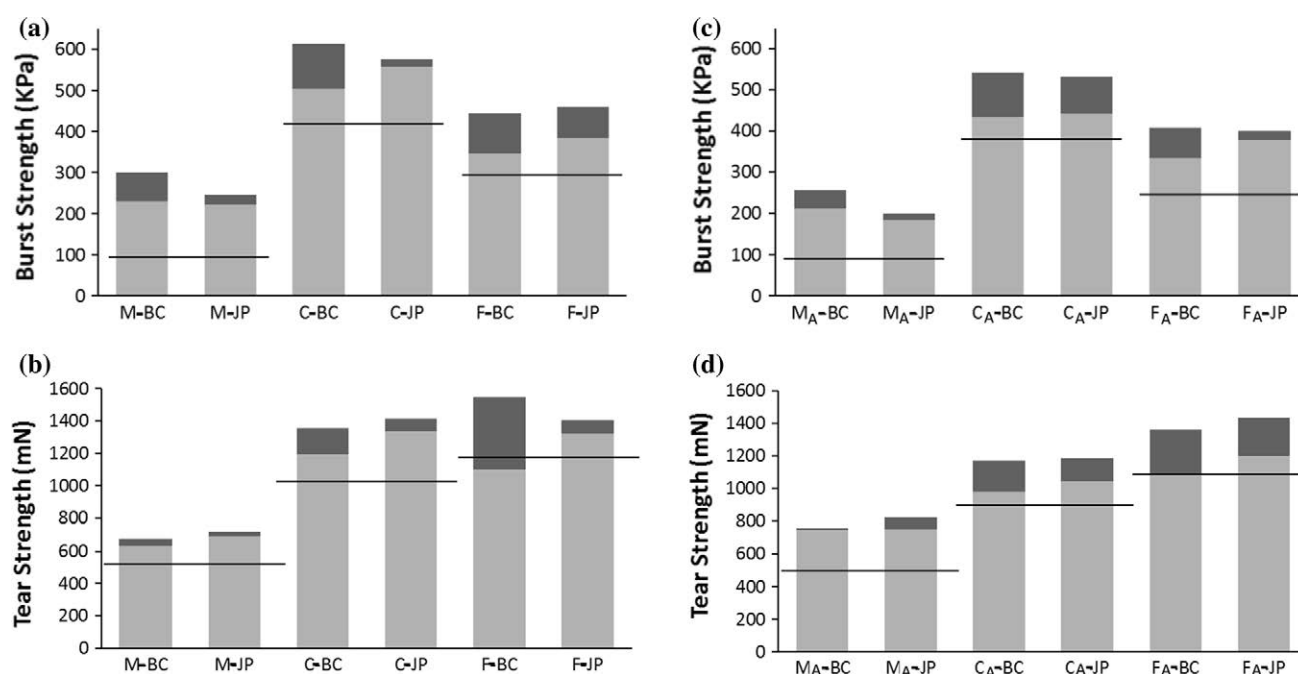


Fig. 1 Mechanical properties of lined samples. *Grey square* aged lined samples *black square* non-aged lined samples. *Horizontal lines* represent the values of the model papers, non-aged and aged, before

lining. **a** Burst strength of non-aged model papers, **b** tear strength of non-aged model papers, **c** burst strength of aged model papers, **d** tear strength of aged model papers

Table 2 Gloss (%) of model papers and lined samples

Model paper	Non-lined	Lined with BC		Lined with JP	
		Non-aged	Aged	Non-aged	Aged
<i>F</i>	3.85	17.58	19.07	4.97	4.25
<i>F_A</i>	3.90	13.80	19.23	4.68	4.75
<i>M</i>	5.68	19.23	22.85	4.65	5.20
<i>M_A</i>	5.13	18.18	24.67	5.63	5.05
<i>C</i>	6.20	15.05	15.93	4.58	4.63
<i>C_A</i>	6.35	19.90	19.05	5.48	5.50

Table 3 Opacity (%) of model papers and lined samples

Model paper	Non-lined	Lined with BC		Lined with JP	
		Non-aged	Aged	Non-aged	Aged
<i>F</i>	80.44	86.86	89.77	83.14	86.78
<i>F_A</i>	85.97	89.05	89.87	87.42	88.69
<i>M</i>	96.87	97.44	96.26	95.59	95.36
<i>M_A</i>	97.55	95.61	95.01	95.84	97.71
<i>C</i>	71.12	78.51	85.33	75.21	80.70
<i>C_A</i>	74.00	80.53	82.75	77.36	82.41

When model papers are lined with JP, the modification in both variables, L^* and b^* , is low (<1 point). Whereas when BC is used as reinforcing material, the modification is a little bit higher, L^* decreases in 1 point in mechanical sheets and in 5 points in the other two type of papers. b^* increases in 2 points in mechanical sheets and approximately 8 points in the other papers.

When the reinforcing material is JP, and chemical and filter papers are previously aged, the modifications in L^* and b^* are very low (<1 point). Lining with BC leads to changes close to 5 points. Moreover, when mechanical papers are aged, changes are low for BC (approx. 1 point) and higher with JP (<3 points).

To evaluate the stability of aged and non-aged model papers, they were subjected to an aging process after lining

with BC or JP. In all cases, L^* decreases 1–4 points and b^* increases 2–7 points, although no significant differences are observed neither with the papers to be reinforced nor with the reinforcing materials.

In the light of these results, the optical properties were not noticeably modified by lined process, although when JP is used as reinforcing material, changes are even lower than with BC. With both reinforcing materials, the optical properties of all lined papers are stable over time. All these optical properties have been evaluated using unprinted model papers. Nevertheless, the real documents to restore could be printed papers. Assessing how the reinforcement affects the legibility of the restored document should be of interest in future studies.

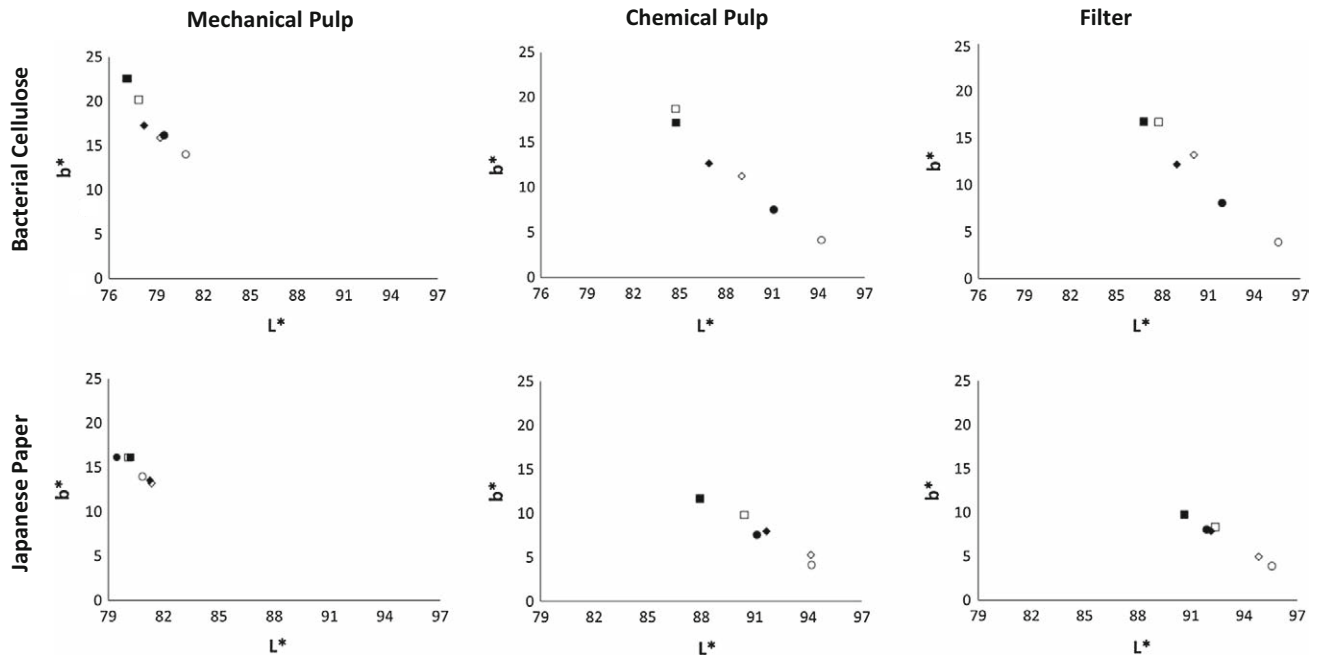


Fig. 2 $L^*a^*b^*$ coordinates of the model papers (white circle), lined samples (white lozenge), and lined and aged samples (white square). The symbols are filled when the model paper is aged

SEM has been used to study the mechanism in which the model papers and the reinforcing material are joined. The study reveals that there is no difference neither with the original model papers nor with the aged ones (data not shown). Hence, the differences with respect to the reinforcement with JP and BC are shown using only mechanical sheets. The main difference lies on the structure of the reinforcing materials. While the BC presents a layered structure, the JP shows a typical fibrous paper structure. Figure 3 shows the fibrous structure of JP. It can be observed that the linkage with the model paper is very close.

The assembling between BC and the model paper (Fig. 4) is also very close. The images are acquired at different magnifications showing the layered structure of BC and its linkage with the mechanical sheets. Nanofibrils in the contact area of both materials can be observed. This may indicate the efficiency of the linkage. This point is supported by the internal bond test (TAPPI T569), which determines the strength of paper in its thickness direction. The integrity of the bonding surface of the lined samples was tested, concluding that in all cases the model paper was delaminated in two layers; however, the binding was never broken.

This study was also made after the aging process, and it was observed that there were no significant differences in the structure (data not shown).

The topography of the samples was assessed by LP. The surface morphology of the model papers and the aged ones

was similar (data not shown). The main difference is caused by the reinforcement material (Fig. 5). Samples lined with BC have a smoother surface due to the layered structure of this reinforcing material. Nevertheless, the JP fibrous structure is evidenced in samples lined with it.

The micro-roughness described by the facet orientation was quantified using also LP. The results indicate that the BC application reduces the surface roughness significantly in all the model papers (Fig. 6), confirming the previous results. The surface topography is one of the factors affecting the glossy appearance of paper. The facet orientation is relatively high for all the samples, indicating a low gloss level (4–25 %). This is in accordance to previously presented models [28]. BC application reduces the surface roughness significantly (Fig. 6), which is in agreement with an increment of the corresponding gloss levels.

The structural difference between JP and BC is reflected by the Gurley air permeance values of lined samples. Model papers have air permeability values lower than 55 s. When BC is applied, the Gurley air permeance values exceed the upper limit of that considered by the paper-making industry in all cases (>900 s). On the other hand, papers lined with JP exhibit air permeability values <75 s. The aging process does not significantly modify the results. This result indicates that the closed structure of the BC prevents the air flow therethrough, which could be beneficial for protecting papers against atmospheric pollutants. This agrees with Yousefi et al. [38], who found that paper made with BC has no air permeability.

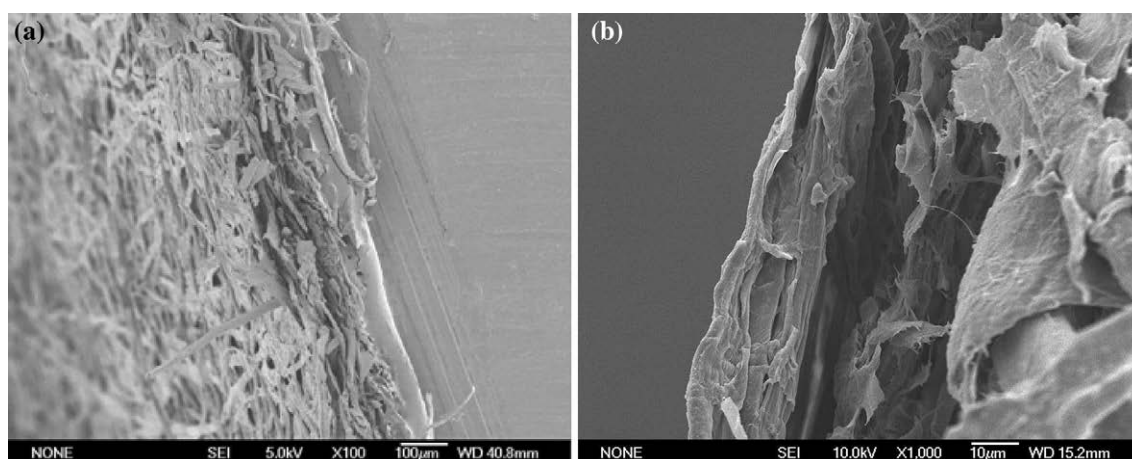


Fig. 3 SEM images at different magnification of mechanical non-aged samples lined with JP

Paper wettability was studied through the measurement of α and α_d with distilled water. The α values are shown in Table 4. The lining process causes the increment of α values, which means that the paper resistance to wetting is enhanced. The increment of α is due not only to the reinforcing material (JP or BC), but also to the starch used in the lamination process. Starch is a sizing agent, which is commonly used in the paper industry to reduce the wettability of the paper surface [39, 40].

The BC and the JP laminated samples showed different wettability behaviors. When using BC as the reinforcing material, the obtained α values were independent of the model paper that was restored. The values range from 70° to 87°. The relatively large variation is probably due to irregularities of the surface [32, 33, 41]. The application of starch is done manually and may result in a not completely uniform surface. Although the low porosity of the BC material (Gurley air permeability >900 s, Table 1) probably yields an inhomogeneous layer of starch on the surface, the starch leads to a similar degree of sizing for all the samples. In contrast, for JP-lined samples, the α values vary from 55° to 93°, which is a wider range. This is due not only to the manual starch application, but also to the high porosity of JP (Gurley air permeability <5 s, Table 1). The starch migrates from the surface into the bulk structure, causing these differences.

Taking into account that α values differed between the three model papers, it can be concluded that the resulting α values are not influenced by the properties of the base paper when BC is used as reinforcing material. On the other hand, for the JP-lined samples, the characteristics of the base paper seem have a marked effect on α .

Regarding the effect of the aging on the α values for non-lined samples, the α values increase with aging

consequently (Table 4). However, for lined samples, the behavior is irregular, this parameter in some samples increases and in other decreases after the aging process. This could be related to the reaction that suffers the starch at a high temperature. This is in concordance with Andersson et al. [42], which found an α increment in a starch film when the climate conditions change from 23 °C/50 % RH to 80 °C/70 % RH.

The wettability of the samples was also studied by examining how α values change with time (Fig. 7). In order to compare the assessed samples, α values were normalized in relation to the corresponding initial values at 0 s. Figure 7 shows the graphs of the evolution of normalized α in non-aged model papers, before and after the lining with BC and JP. As it can be observed, each model paper has a different dynamic wettability. The water wets and spreads faster in *F* and *M* than in *C*. The dynamic wettability values are reduced when the samples are reinforced with JP, and even more when the paper is treated with BC. In a previous study [37], it was found that BC layers present wettability rates rather low, which confirms that the wettability seems to be independent of the model paper studied. The behavior of the evolution of normalized α in aged model papers, before and after the lining with BC and JP, follows the same pattern.

Figure 8 shows the *W* values for each lined sample. The samples lined with BC show similar wettability rates from 3.5 to 6.5 % s⁻¹. In contrast, the samples lined with JP show higher and more variables values, from 6 to 14 % s⁻¹. No data could be obtained for *F*-JP and *F_A*-JP because in these samples the water was absorbed into the paper very quickly and drops rested on it for <0.50 s. For samples lined with BC, the wettability seems to be independent of the base paper properties, while these properties have a noticeable influence on the wettability of the sample

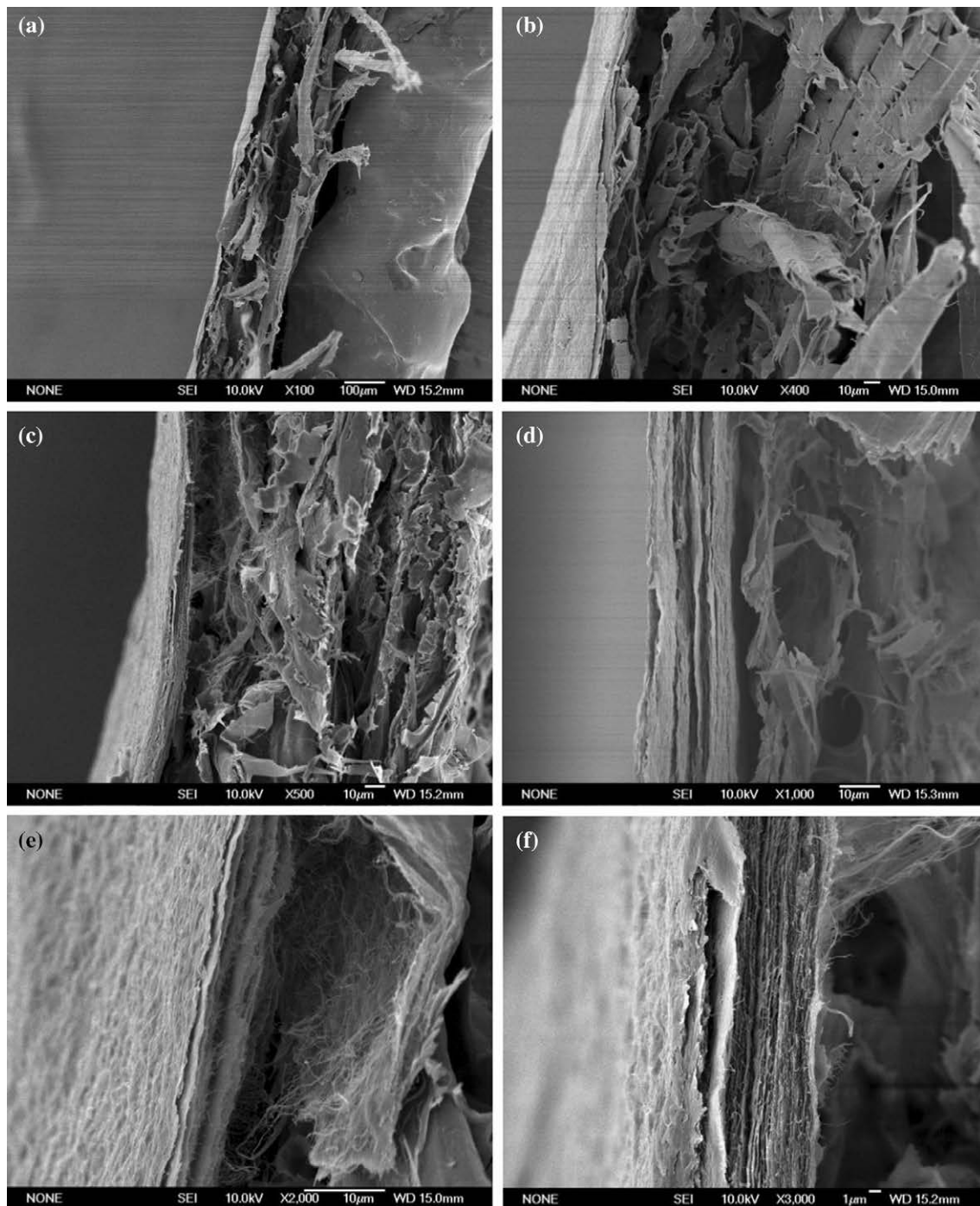


Fig. 4 SEM images at different magnifications of mechanical non-aged samples lined with BC

reinforced con JP. This is consistent with the results previously discussed for α . Also, Fig. 8 shows that the aging process decreases the wettability rate in all the lined samples. This may be due to the curing of starch, which increases the hydrophobicity of the samples [42].

Conclusions

As has been demonstrated, BC has certain features that could be of interest in preserving cellulosic material. Comparing the two reinforcing materials, BC and JP,

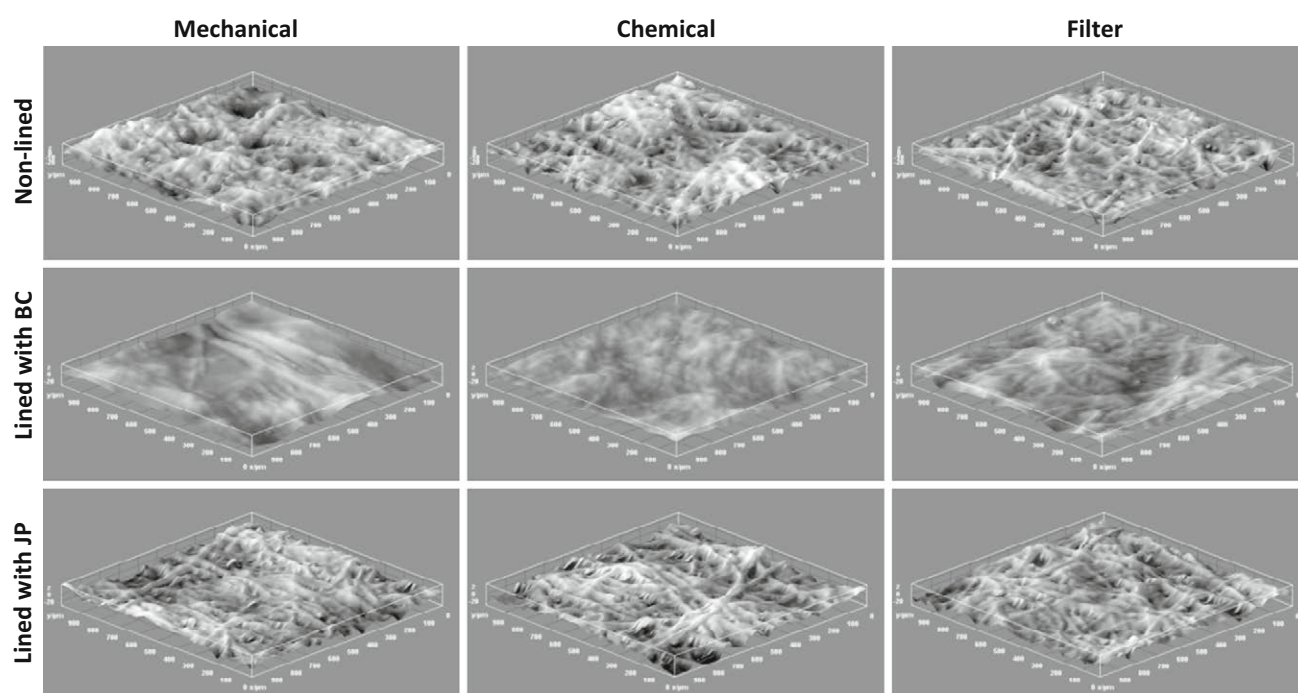


Fig. 5 LP images of the different non-aged samples, non-lined and lined with BC and JP

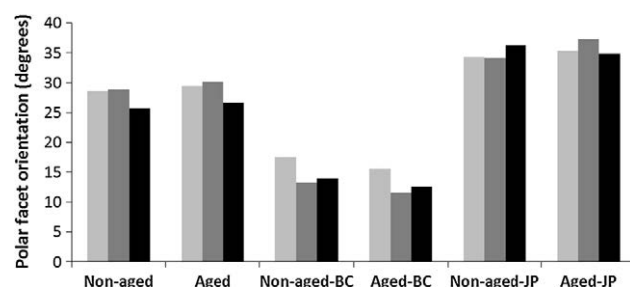


Fig. 6 LP Analysis. Polar facet orientation of the non-aged samples. Clear grey square filter, dark grey square mechanical, Black square chemical

Table 4 Static contact angle (°) of model papers and lined samples

Model paper	Non-lined	Lined with BC		Lined with JP	
		Non-aged	Aged	Non-aged	Aged
<i>F</i>	23.13	79.42	83.53	58.63	63.00
<i>F_A</i>	32.55	69.92	71.35	54.40	57.30
<i>M</i>	60.39	87.37	80.92	82.03	81.79
<i>M_A</i>	66.86	81.12	74.70	85.12	92.64
<i>C</i>	52.00	75.66	63.38	92.40	71.94
<i>C_A</i>	61.54	86.47	77.00	80.69	79.20

the BC thickness is lower with a similar grammage. Additionally, BC layers have higher burst strength and lower opacity. On the other hand, JP has higher tear resistance. Both materials show similar $L^*a^*b^*$

coordinates. Due to the difference of gloss of both materials, each of them may be used to restore different type of documents. The most important difference refers to the air permeance, in which both materials show different behaviors.

Irrespective of the lining material (BC or JP), no important differences are found on the lined papers with respect to the burst and tear strength, opacity, and L^* , a^* optical coordinates. Nevertheless, BC-lined papers present higher gloss values in all cases than those lined with JP. Hence, BC is suitable for restoring different groups of papers, including tracing paper, coated, parchment, and vellum. In addition, BC leads to an increase of the b^* coordinate, which indicates a trend to yellowing. This can be considered an advantage if the paper to restore presents high yellowness, which is common in old papers.

Other important difference between both reinforced materials is the wettability. In papers lined with BC or JP, the wettability decreases, but in papers lined with BC, this effect is much more marked and independent of the paper model. The decrease in wettability caused by BC is related to the reduction in air permeance.

When the lined papers go through an aging process, there are no important changes in any characteristic regarding non-aged lined samples, except in b^* and L^* color coordinates, as expected. It can also be observed that the accelerated aging process decreases the wettability rate

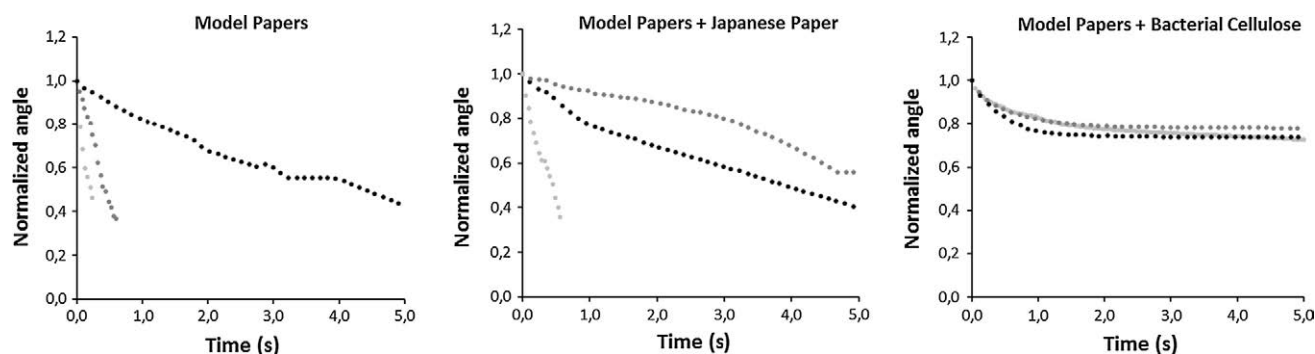


Fig. 7 Dynamic contact angle of model papers and lined samples. Clear grey square filter, grey square mechanical, black square chemical

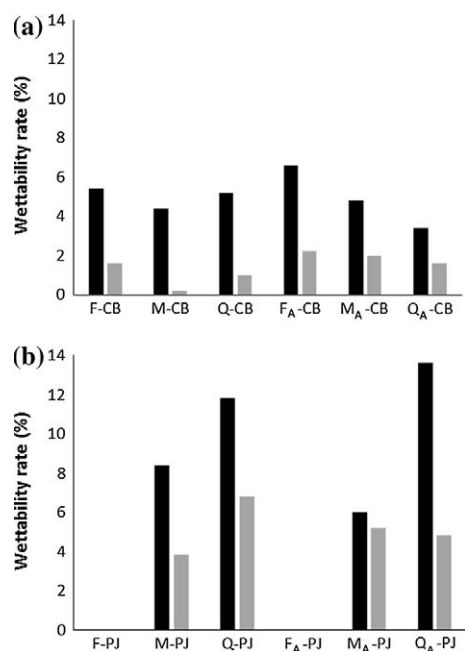


Fig. 8 Wettability rate at 5 s for model papers and reinforced samples. Grey aged lined samples black square non-aged lined samples

in all the lined samples. Hence, the stability over time of papers lined with BC is proved in this study.

Finally, the use of BC as reinforcing material may offer advantages for specific conservation treatments, being more suitable for certain types of paper than JP, currently used as a restoration material.

Acknowledgements The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via Project CTQ 2010-17702, and the Madrid Regional Government via Project RETO PROSOST P2013-MAE2907.

References

- Bielecki S, Krystynowicz A, Turkiewicz M, Kalinowska H (2005) Bacterial cellulose. In: Steinbuchel A (ed) Biotechnology of polymer: from synthesis to patents. Wiley, Weinheim, pp 381–434
- Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A (2000) Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. J Mater Sci 35:261–270
- Ramana KV, Tomar A, Singh L (2000) Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. World J Microbiol Biotechnol 16:245–248
- Santos SM, Carbajo JM, Villar JC (2013) The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconacetobacter sacrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. BioResources 8:3630–3645
- Jonas R, Farah LF (1998) Production and application of microbial cellulose. Polym Degrad Stab 59:101–106
- Yamanaka S, Ishihara M, Sugiyama J (2000) Structural modification of bacterial cellulose. Cellulose 7:213–225
- Brett CT (2000) Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition and integration into the cell wall. Int Rev Cytol 199:161–199
- Nakagaito AN, Nogi M, Yano H (2010) Displays from transparent films of natural nanofibers. MRS Bull 35:214–218
- Castro C, Zuluaga R, Putaux JL, Caro G, Mondragon I, Gañán P (2011) Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. Carbohydr Polym 84:96–102
- Brown RM Jr (1989) Bacterial Cellulose. In: Kennedy JF, Phillips GO, Williams PA (eds) Cellulose: structural and functional aspects. Ellis Horwood Ltd, New York, pp 145–151
- Watanabe K, Eto Y, Takano S, Nakamori S, Shibai H, Yoshinaka S (1993) A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. Cytotechnology 13:107–114
- Sokolnicki AM, Fischer RJ, Harrah TP, Kaplan D (2006) Permeability of bacterial cellulose membranes. J Membr Sci 272:15–27
- Czaja WK, Young DJ, Kaweck M, Brown RM (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. Biomacromolecules 8:1–12
- Wan W, Millon L (2005) Poly (vinyl alcohol)-bacterial cellulose nanocomposite, US Patent 2005/0037082 A1
- Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P (2006) Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. Biomaterials 27:2141–2149

16. Yano S, Maeda H, Nakajima M, Hagiwara T, Sawaguchi T (2008) Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites loaded with silica nanoparticles. *Cellulose* 15:111–120
17. Pommet M, Juntaro J, Heng JYY, Mantalaris A, Lee AF, Wilson K, Kalinka G, Shaffer MSP, Bismarck A (2008) Surface modification of natural fibers using bacteria: depositing bacterial cellulose onto natural fibers to create hierarchical fiber reinforced nanocomposites. *Biomacromolecules* 9:1643–1651
18. Surma-Ślusarska B, Danielewicz D, Presler S (2008) Properties of composites of unbeaten birch and pine sulphate pulps with bacterial cellulose. *Fibres Text East Eur* 16:127–129
19. Sánchez Hernampérez A (1999) Políticas de conservación en bibliotecas. Arco Libros, Madrid
20. Smook GA (1990) Handbook for pulp and paper technologists. TAPPI Press, Atlanta
21. Sjöström E, Westermarck U (1999) Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Sjöström E, Alen R (eds) Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. Springer, New York, pp 1–19
22. Lindström T (2009) Sizing. In: Ek M, Gellerstedt G, Henriksson G (eds) Pulp and paper chemistry and technology, vol 3., De Gruyter, Stockholm, Sweden, pp 275–318
23. Baty JW, Maitland CL, Minter W, Hubbe MA, Jordan-Mowery SK (2010) Deacidification for the conservation and preservation of paper-based works: a review. *BioResources* 5:1955–2033
24. Ahn K, Rosenau T, Potthast A (2013) The influence of alkaline reserve on the aging behavior of book papers. *Cellulose* 20:1989–2001
25. Ardelean E, Bobu E, Niculescu GH, Groza C (2011) Effects of different consolidation additives on ageing behavior of archived document paper. *Cellul Chem Technol* 45:97–103
26. Bansa H, Ishii R (1997) The effect of different strengthening methods on different kinds of paper. *Restaurator* 18:51–72
27. Hestrin S, Schramm M (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J* 58:345–352
28. Chinga-Carrasco G, Kauko H, Myllis M, Timonen J, Wang B, Zhou M, Fossum JO (2008) New advances in the 3D characterization of mineral coating layers on paper. *J Microsc* 232:212–224
29. Owen A, Fiske B, Barrett T, McClintock TK, Volent P, Nicholson K, Kruth L, Rodger S (1988) Lining. Chap. 29 in paper conservation catalog. American Institute for Conservation Book and Paper Group, Washington D.C. http://cool.conservation-us.org/coolaic/bpg/pcc/17_sizing-resizing.pdf. Accessed 22 Mar 2013
30. Torres FG, Troncoso OP, Torres C, Grande CJ (2013) Cellulose based blends, composites and nanocomposites. In: Sabu T, Visakh PM, Mathew, Aji P (eds) Advances in natural polymers. Composites and nanocomposites. Springer, New York, pp 21–54
31. Yamauchi T, Murakami K (2001) Porosity and gas permeability. In: Borch J, Lyne MB, Mark RE (eds) Handbook of physical testing of paper, vol 2. Springer, New York, pp 267–302
32. Swain PS, Lipowsky R (1998) Contact angle on heterogeneous surfaces: a new look at Cassie's and Wenzel's laws. *Langmuir* 14:6772–6780
33. Tåg CM, Pykönen M, Rosenholm JB, Backfolk K (2009) Wettability of model fountain solutions: the influence on topographical and physical properties of offset paper. *J Colloid Interface Sci* 330:428–436
34. Hubbe MA, Pawlak JJ, Koukoulas AA (2008) Paper's appearance: a review. *BioResources* 3:627–665
35. Karlovits M, Gregor-Sveteć D (2011) Comparison of durability between UV inkjet and conventional offset prints exposed to accelerated ageing. *JGED* 2:10–15
36. Van der Reyden D, Baker M, Hoffman C (1993) Effects of aging and solvent treatments on some properties of contemporary tracing papers. *JAIC* 31:177–206
37. Santos SM, Carbajo JM, Quintana E, Ibarra D, Gómez N, Ladero M, Eugenio ME, Villar JC (2015) Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. *Carbohydr Polym* 116:173–181
38. Yousefi H, Faezipour M, Hedjazi S, Mousavi MM, Azusa Y, Heidari AH (2013) Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibres and fibres/ground cellulose nanofibres of canola straw. *Ind Crop Prod* 43:732–737
39. Moutinho I, Figueiredo M, Ferreira PJ (2004) Influência dos agentes de colagem superficial na estrutura do papel: uma análise química. In: Jiménez L, Villar JC (eds) Proceedings of III CIA-DICYP. INIA, Madrid, pp 377–383
40. Etzler FM, Buche M, Bobalek JF, Weiss MA (1995) Surface free energy of paper and inks: printability issues, papermakers conference. TAPPI Press, Chicago, pp 383–394
41. Ferreira PJT, Moutinho IMT, Figueiredo MML (2008) How paper topography affects contact angle measurement. In: Turrado J (ed) V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel CIADICYP 2008. Grafisma, Guadalajara, pp 66–69
42. Andersson C, Jonhed A, Järnström L (2008) Composition and film properties of temperature responsive, hydrophobically modified potato starch. *Starch* 60:539–550

Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration. Part II: application on real samples

Sara M. Santos¹ · José M. Carbajo¹ · Nuria Gómez¹ · Ester Quintana¹ · Miguel Ladero² · Arsenio Sánchez³ · Gary Chinga-Carrasco⁴ · Juan C. Villar¹

Received: 10 July 2015 / Accepted: 1 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Preservation of documentary heritage is one of the biggest challenges facing paper conservators today. The singular properties of bacterial cellulose (BC) lead us to propose to reinforce paper with BC sheets. In the first part of this study, the reinforcing capability of BC was tested on model papers of well-known fiber composition. The aim of the present study was to verify the suitability of rebuilding degraded old papers with BC. The degraded papers were characterized before and after the reinforcement. In addition, lined samples were characterized before and after an aging process in order to study the stability in time. The same methodology was used with Japanese paper (JP), a material commonly used by paper conservators, in order to compare both materials as reinforcement. Mechanical properties of paper lined with BC are as good as those obtained with JP. Papers lined with BC have more marked modifications on their optical properties than those restored with JP. Nevertheless, letters in books lined with BC are more legible. Moreover, only the papers restored with BC

show high changes in porosity. The aging process leads to a slight decrement in burst index. Changes on tear index and optical properties with the aging process depend on the paper to be restored. This study suggests that BC improves deteriorated paper quality, without altering the information contained therein, and that this improvement is maintained over time. Hence, BC is a promising alternative material for the restoration of paper.

Introduction

Restoration of degraded paper is especially important for papers produced between 1860 and 1960, because in those years most of them were produced using mechanical wood pulp and/or sized with rosin resins. The main characteristic of the papers made from mechanical wood pulp is the presence of lignin [1], which is degraded by the action of the environment producing radicals and generating acid

✉ Sara M. Santos
santos@inia.es

José M. Carbajo
chema@inia.es

Nuria Gómez
nuria@inia.es

Ester Quintana
quintana.ester@gmail.com

Miguel Ladero
mladero@quim.ucm.es

Arsenio Sánchez
arsenio.sanchez@bne.es

Gary Chinga-Carrasco
gary.chinga.carrasco@pfi.no

Juan C. Villar
villar@inia.es

¹ Laboratory of Cellulose and Paper, Forest Research Center, INIA, Ctra.de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

² Departament of Chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

³ Restoration Laboratory, Biblioteca Nacional de España, Pº de Recoletos 20-22, 28071 Madrid, Spain

⁴ Paper and Fiber Research Institute (PFI), Høgskoleringen 6b, 7491 Trondheim, Norway

groups. Paper sizing with rosin has to be made at acid pH [2]. In both cases, an acid hydrolysis is produced causing a loss of paper strength with time. This loss of mechanical properties is significantly lower in papers made with pure cellulose and with no acid sizing.

Since the early 1970s, the search for solutions to the problem of acidic paper has been approached from a predominantly working line: neutralize the acids in the paper by treatment with alkaline agents. This process is called deacidification, in which two fundamental processes are involved: neutralizing acids and creating a pool of basic substances (alkaline reserve) in order to conserve the paper from future acid attacks [3].

Paper deacidification is able to extend the lifespan of treated papers from four to five times [4], thus slowing the degradation process. However, paper deacidification does not recover the physical–mechanical properties of paper lost by aging [5]; therefore, it is imperative to find out better solutions for the consolidation of the deteriorated supports. The British Library developed a patent in the 1990s based on polymerization of styrene, methyl methacrylate, and ethyl acrylate. However, the process never was sufficiently optimized, and consequently, this line of research was discarded.

Nowadays, one of the most common methods used to restore damaged papers is named “lining” [6]. This method consists in applying a reinforcing paper to the damaged document. Japanese papers (JPs), known as “washi papers,” are commonly used to restore documents by lining old papers with them. These papers are made with very long fibers from kozo, gampi, or mitsumata, three typical Japanese plants that provide high resistance with very low basis weight.

On the other hand, the ability of bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* to produce high-quality cellulose is well known [7]. It produces extracellular cellulose microfibrils to provide a firm matrix that floats and, therefore, allows the embedded bacteria to stay in close contact with the atmosphere. The macrostructure of this bacterial cellulose (BC) is fully dependent on the culture conditions; in static conditions is generated a film at the air/liquid culture medium.

The physical and mechanical properties of BC arise from their unique structure: high crystallinity, high tensile strength, elasticity, large surface area, etc [8]. Yamanaka et al. [9] concluded that a sheet prepared from a gel-like pellicle of BC has been found to have the highest Young’s modulus ever known in two-dimensional organic materials (>15 GPa). Retegui et al. [10] found that BC has an excellent biological affinity.

BC has been widely studied, and numerous applications have been developed, for example, its use as potential biological substrate [11, 12], paper [13, 14], matrix protein

immobilization or chromatographic packings [13, 15] and in the biomedical field [16, 17]. BC has been also widely used as reinforcement agent for composite applications. For instance, as reinforcement agent in glycerol-plasticized cassava starch bionanocomposites, BC increased the elastic modulus 17 times in comparison to that of the starch matrix [18]. The very good mechanical properties obtained for some nanocomposites reinforced with BC suggest a good interfacial adhesion between BC and the renewable polymers. Being a kind of degradable biopolymer with remarkable mechanical properties [19], BC was selected to restore historic silk textiles. Although all these applications suggest that BC is a potential candidate to be used as a reinforcing material, its use in paper restoration has not been explored sufficiently.

The main goal of this study is to test the feasibility of BC to be used as a reinforcing material in paper restoration. For producing the BC layers, *G. sucrofermentans* has been cultivated on an optimized medium previously described [20]. A purification step to eliminate the bacteria and the culture medium has been included before their application to the document [21]. Afterward, an aging process is applied to evaluate the BC behavior in time, and consequently, the characterizations are made before and after this treatment. The reinforcing capability of BC over papers with different fiber compositions was previously tested on model papers in the first part of this extensive study (Part 1). The conclusions were promising (see Part I of this work), so the present study is focused on real samples. For this purpose, three books from 1940 to 1960 were selected and characterized, before and after reinforcement.

Characterizations of the treated samples have been made in terms of their mechanical properties (tear and burst strength), optical properties (opacity, brightness, yellowness, and gloss), surface properties (wettability and roughness), and air permeance. Mechanical, optical, and surface properties as well as air permeance are parameters of interest in papermaking and, therefore, they would determine the use and durability of BC in paper restoration.

Materials and methods

Microorganism

Gluconacetobacter sucrofermentans CECT 7291 was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT). For maintenance, it was subcultured periodically in HS medium [22]. *G. sucrofermentans* was grown in HS solid medium placed in Petri dishes for 6 days, in order to obtain the suspension of bacterial cells to be used in the further experiments. 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of liquid HS medium were inoculated with these

plates and cultivated in static conditions for 4 days. Subsequently, the pellicles formed were cut in small pieces (about 1 cm × 1 cm) in sterile conditions and shaken with the liquid medium at 700 rpm for 30 min. The suspension obtained was filtered through gauze, centrifuged at 4000 rpm for 10 min and, after removing the supernatant, the pellet was washed with Ringer's solution (NaCl, 2.5 g L⁻¹; KCl, 0.105 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O, 0.120 g L⁻¹; and NaHCO₃, 0.05 g L⁻¹). This solution was centrifuged again under the same conditions, and the pellets were resuspended in a small volume of Ringer's. The optical density of the solution was adjusted to be in the range of 0.59–0.64 (McFarland standards 3–4) with a wavelength of 600 nm upon diluting with Ringer's solution. 250 µL of this final solution were used to inoculate 100 mL of medium.

Cellulose layers' production and purification

Culture medium used for BC production was a modified HS medium (fructose, 20 g L⁻¹; yeast extract, 5 g L⁻¹; corn steep liquor, 5 g L⁻¹; Na₂HPO₄, 2.7 g L⁻¹; and citric acid, 1.15 g L⁻¹) with 1 % ethanol addition. In all cases, 100 mL of liquid medium was added to 150-mm Petri dishes, inoculated with the suspension described above and cultivated at 30 °C under static conditions. Cellulose layers were collected after 7 days of cultivation. The cellulose pellicles were washed with distilled water. To purify the BC, the pellicles were incubated at 90 °C in 1 % NaOH for 60 min. After the treatment, the pellicles were exhaustively washed with continuous distilled water and dried by filtering through a medium-porosity filter paper in a Buchner funnel. Subsequently, the cellulose layers were air dried.

Damaged books

Three books from 1940 to 1960 were selected according to their fibrous composition: book 1 (B₁) was made with chemical pulp from cereal straw; book 2 (B₂) was made mainly with chemical and semi-chemical pulp from softwood; and book 3 (B₃) was made mainly with softwood mechanical pulp. All of them have a surface pH in the range of 4–5.

Paper reinforcing

Lining is a general term for fusing together thin layers of different materials [6]. In archival contexts, lining refers specifically to the process of layering a sheet of archival paper with stronger materials, in order to strengthen the object. JP and BC were used in this study to evaluate their reinforcing capacity, using wheat starch as adhesive. The JP used as reinforcing material was Tengucho (Awagami

Papers), which was selected because it is one of the most common JPs used in restoration (basis weight of 9 g m⁻², white, 100 % Kozo fibers, unsized).

Lining was performed following the traditional Japanese method. Previously, wheat starch was prepared in a proportion of 1:3 volumes of water, stirred, and cooked in microwave, stirring every 30 s until boiling for three times. After cooling it for 24 h, the starch paste is passed three times through a sieve of horsehair, then diluted in water three times, and batted with a brush and water to achieve the right consistence. The first step of the lining process was to spray with water the book sheet, and to apply the starch on the reinforcing material (BC or JP) with a brush. The reinforcing material was then applied on the book sheet using a palm fiber brush, also used to smooth the surface and to eliminate possible wrinkles. Afterward, the reinforced sheet was hit with an Uchibake brush to remove bubbles. Finally, it was air dried.

Ten sheets of each selected book were lined with BC (B₁-BC, B₂-BC, and B₃-BC) and ten with JP (B₁-JP, B₂-JP, and B₃-JP).

Aging process

Ten lined sheets from each selected book, five reinforced with JP and five with BC, were submitted to an accelerated aging process ([B₁-BC]_A, [B₂-BC]_A, [B₃-BC]_A, [B₁-JP]_A, [B₂-JP]_A, and [B₃-JP]_A) according to ISO 5630-3:1996 under 80 °C and 65 % relative humidity for 144 h.

Paper characterization

Paper characterization was performed before and after the reinforcement. Reinforced samples were also characterized after the aging process. In all cases, the samples were treated under conditions of standard atmosphere (23 °C and 50 % relative humidity) according to ISO 187:1990 prior to their testing.

The physical properties determined were burst strength (ISO 2758:2014) and tear strength (ISO 1974:2012). A reflectometer Elrepho 070 was used to obtain the optical properties: brightness (ISO 2470-1:2009), opacity (ISO 2471:2008), and yellowness (SCAN G5:1994). Specular gloss was determined using an angle of incidence of 75° (ISO 8254-1:1999). To measure the air permeance of the reinforced papers, a Gurley porosimeter was used (ISO 5636-5:2013). Each property has been tested at least in five replicates, and the standard deviation is always under 10 %.

Static contact angles (α) and dynamic contact angles (α_d) were measured for distilled water using a DataPhysics Instrument OCA 15 plus, running on SCA 20/21 software, and using the sessile drop method. For static angles, the

images were captured by a CCD camera immediately after the drop rested on surface. The corresponding contact angle is calculated after fitting the drop contour line numerically, using the Young–Laplace method. In this study, 20 drop tests were conducted, using 2 μL of drop volume. Dynamic contact angles were assessed monitoring the change of the contact angle with water as a function of time. For each sample, eight videos recorded the evolution of the drop for 300 s, taking two frames per second, and applying droplets of 2 μL .

To evaluate the influence of the reinforcing materials on the legibility of the books, samples were observed by means of optical microscopy. A stereoscopic microscope, at 20 and 60 magnifications, and a binocular microscope using incident light at 100 magnifications, were used to observe the texts. Microphotographs were taken with a digital camera attached to the equipment.

The morphology of the reinforced sheets have been studied by means of Scanning Electron Microscopy (SEM) using a JEOL JSM 6335 F at 1 kV (at a maximum resolution of 5 nm) to avoid energetic degradation of the samples during SEM observation. Samples have been previously cryofractured after immersing them into liquid nitrogen, metalized with gold for 3 min and stored for 16–18 h at 50 °C in a vacuum stove (20 mmHg) to avoid the presence of water in the samples, before proceeding with SEM observations.

Samples of 10 mm \times 10 mm were coated with a layer of gold for LP analysis (Lehmann, Lehman Mess-Systeme AG, Baden-Dättwil, Germany). Ten LP topography images were acquired from each sample. The lateral and z-resolution of the LP system was 1 μm and 10 nm, respectively. The size of the local areas was 1 mm \times 1 mm. The surfaces were horizontally leveled. The micro-roughness was assessed as a function of wavelength, between 5 and 320 nm. For details, see [23].

Results and discussion

Mechanical properties

Figure 1 shows the mechanical properties of the samples, before and after the aging process. As can be observed (Fig. 1a), the tear strength increases with the treatments. When samples undergo an aging process, the tear strength decreases but never falls below the original value. Both reinforcing materials, BC and JP, lead to an increment in the burst strength (Fig. 1b). After the aging process, there is a decrement of this property, but anyway, it remains higher than in the samples without reinforcement. Zou (1996) [24] found that cellulose degradation during aging leads to the loss of the mechanical properties of paper.

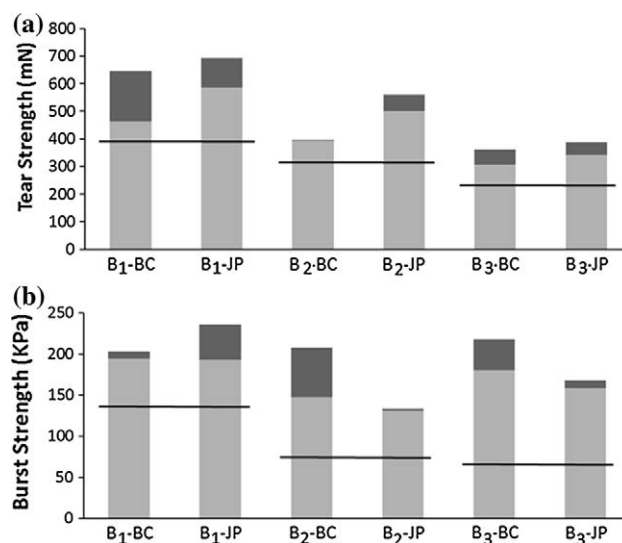


Fig. 1 Mechanical properties. Aged lined samples (grey square), non-aged lined samples (black square). **a** Tear strength, **b** burst strength. Horizontal lines show the original values of each book before lining

Regarding the abilities of BC and JP to reinforce damaged papers, it depends on the material to be restored. With the two reinforcing materials, B₁ shows a high increment in tear strength and a moderate one in burst strength, while the improvement in B₃ is mainly achieved in terms of burst strength. However, the main differences in mechanical properties along reinforcing materials are found in B₂, showing an important increment in tear strength only with JP, and a higher increment in burst strength with BC than with JP.

Optical properties

Values of optical properties of the original (non-lined) and treated samples with BC and JP before and after the aging process are shown in Table 1.

In all cases, opacity does not show significant variations, neither with the reinforcement treatment nor with the aging process. BC lining produces an increment in yellowness, while in papers lined with JP, this property remains at the original value. With both reinforcing materials, the aging process promotes an increment in yellowness, more noticeable in the case of BC. This could be explained because cellulose can become air-oxidized at elevated temperature, while in the presence of humidity, it can give rise to carbonyl species which absorb blue light [25].

Nevertheless, brightness fades when BC is used as the reinforcing material, but with JP this fading either does not take place or occurs moderately. Aging process always causes a loss in brightness, which is more pronounced with BC. These results are in accordance with [21], which

Table 1 Optical properties of the original and samples lined with BC and JP before and after the aging process

	Yellowness (%)	Opacity (%)	Brightness (%)	Gloss (%)
Book 1				
Non-lined	28.99	97.81	53.65	4.35
BC				
Non-aged	37.15	95.19	44.24	20.40
Aged	50.69	95.05	31.64	23.43
JP				
Non-aged	24.63	96.72	53.67	4.93
Aged	34.19	98.32	43.59	4.33
Book 2				
Non-lined	28.32	98.40	49.71	5.20
BC				
Non-aged	41.73	95.68	38.72	22.90
Aged	49.59	93.18	33.65	27.70
JP				
Non-aged	27.63	96.88	48.56	4.75
Aged	35.50	94.43	44.53	4.38
Book 3				
Non-lined	45.80	89.73	36.62	7.15
BC				
Non-aged	45.82	88.64	30.14	17.75
Aged	63.04	91.77	22.32	23.30
JP				
Non-aged	49.39	92.32	33.91	5.75
Aged	50.31	92.83	30.73	5.08

characterized BC layers and observed an increment in yellowness and a decrement in brightness after an aging process.

Lining with JP keeps gloss in values close to the original ones. On the other hand, the use of BC to reinforce the samples leads to a modification in this property, although the values of gloss gain are moderate and do not affect readability to a significant degree.

These results suggest that, in terms of optical properties, the JP is more appropriate for reinforcing than BC, because it causes minor changes in the original material. However, these properties have been determined on the unprinted areas of the paper, while, on observing the printed areas, it was found that JP further modifies the readability of the text, as described below in the microscopical studies section.

Microscopical studies

As mentioned before, the modification of the optical properties is more noticeable when BC is used as reinforced material. However, the printed areas (Fig. 2) clearly demonstrate that the JP fibers reduce the legibility of the texts. As can be seen, letters covered with BC are totally

readable. This effect is due to the crystalline structure of BC, as previously mentioned. Since the same behavior is observed in the three books, only B₁ is shown in Fig. 2.

The morphology of reinforced sheets was studied by SEM (Fig. 3). The study revealed that in all cases, the linkage between the reinforcing material and the original sheets is very close. The main difference between BC and JP, is that the first one is structured in smooth layers, while JP has a fibrous structure (Fig. 3). As described below, this structural difference causes considerable changes in several properties, such as porosity and wettability.

The topography of the samples was assessed by LP. The surface morphologies of the books and the aged ones were similar (data not shown). The main difference is caused by the reinforcement material (Fig. 4). Contrary to the apparently rough surface caused by the JP fibrous structure, samples lined with BC evidenced a smoother surface (Figs. 3, 4).

The LP results indicate that the BC application reduces the surface roughness significantly in all the tested books. In order to shed more light on how the material used for lining affects the surface morphology, the LP roughness was assessed at various wavelengths (Fig. 5). The results confirm the smoothening effect of BC on the surface

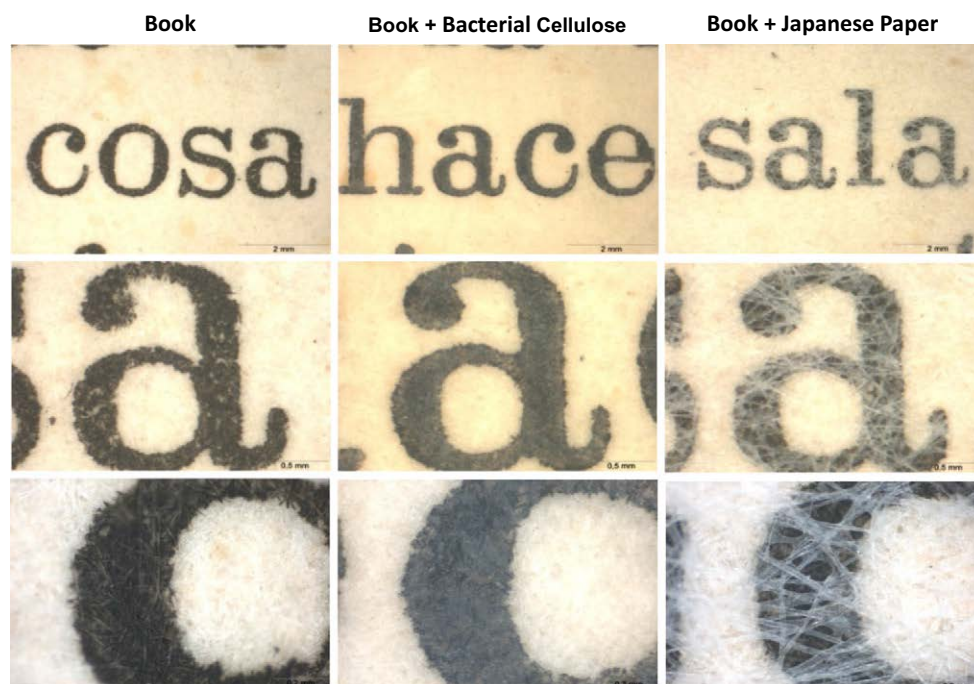


Fig. 2 Microphotographs taken observing Book 1 with a stereoscopic microscope (*first and second rows*), and with an optical microscope (*last row*)

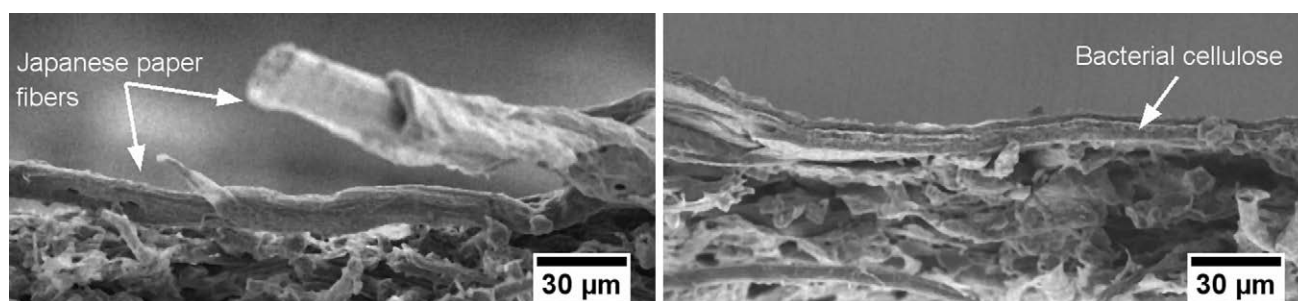


Fig. 3 SEM images of the transversal sections of reinforced sheets from Book 1. The JP fibers (*left image*) and layer with BC (*right image*) on the surface of a Book 1 sheet are exemplified

structure. The effect is clearly evidenced for wavelengths lower than 40–80 μm , indicating that the BC layer is filling cavities created between the fibers of the original papers. On the other hand, the rougher structure created by the JP layer was confirmed.

The surface topography is one of the factors affecting the glossy appearance of paper. In the Part I of this study, it was demonstrated that the facet orientation was relatively high for all the samples, which caused a low gloss level. In the present study, the smoother surface created by the BC layer increases the gloss levels significantly from 4 to 7 % (depending on the book paper) to 18–28% (Figs. 4, 5; Table 1). The rougher JP fibers increase the roughness and consequently caused a slight decrease in the gloss levels.

Surface wettability

Static contact angles (α) are shown in Table 2. All the original books have high α values, which means high hydrophobicity. The high sizing grade of the books could explain this behavior as sizing agents have low water affinity [26, 27].

α values of lined samples are influenced not only by the reinforcing materials but also by the starch used as adhesive. In the first part of this study (Part I), it was observed that α values for model papers lined with BC did not depend on the model paper selected to restore. This was due to the low porosity of BC, which caused that the starch remained on the surface. In contrast, JP presents very high

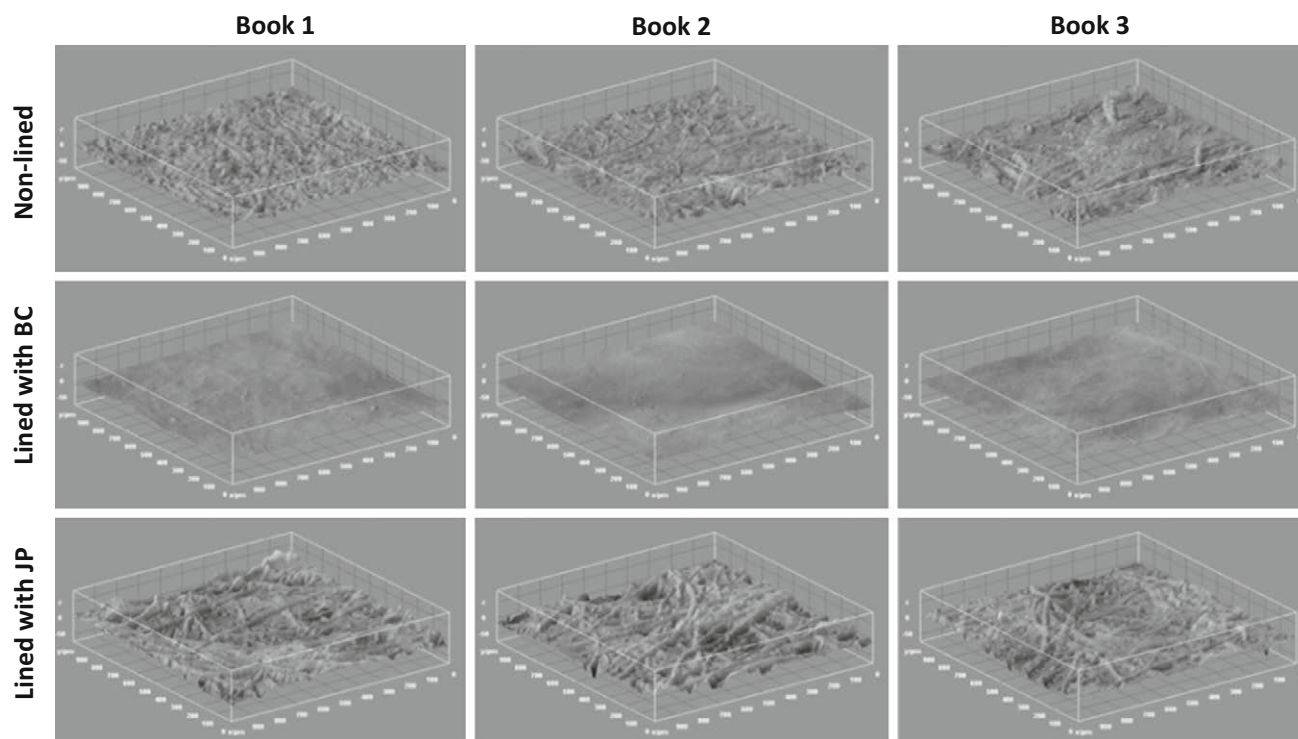


Fig. 4 LP images of the different non-aged samples, non-lined, and lined with BC and JP

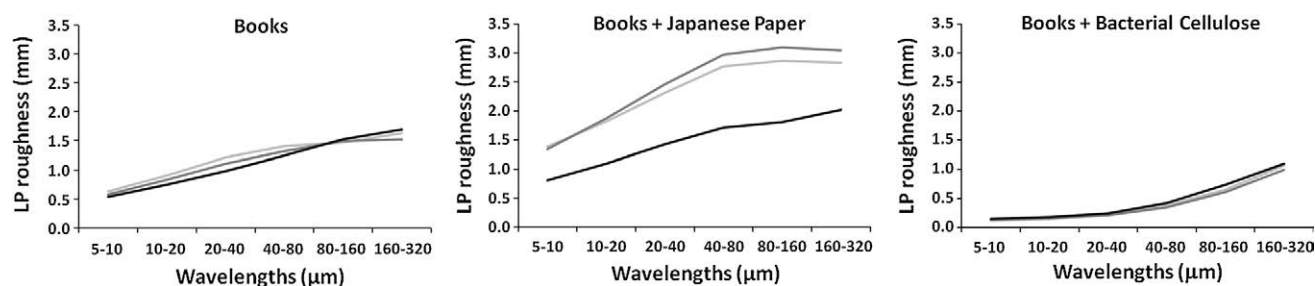


Fig. 5 LP Analysis. The surface roughness as a function of wavelength. Book 1 (*light grey square*), Book 2 (*grey square*), Book 3 (*black grey square*)

Table 2 Static contact angles of the samples (non-aged and aged), non-lined, and lined with BC and JP

	Non-lined	BC		JP	
		Non-aged	Aged	Non-aged	Aged
Book 1	122.6	89.1	80.9	99.3	106.5
Book 2	121.4	88.7	78.5	117.7	116.2
Book 3	118.6	91.5	82.6	101.1	102.9

porosity, so the starch migrates from the surface into the model paper's structure. In this case, the α values depended on the paper to restore.

Although lining with JP leads to a slight decrease of these contact angles, not all of them decreased at the same

rate. BC produces a higher decrement of α , but anyway moderate, reaching similar values in all the BC lined books (around 90°). After the aging process, static contact angles decrease by 10° in all samples treated with BC, whereas with JP, the behavior is irregular. It can be concluded that due to the BC's closed laminar structure (Fig. 3), it offers stable surface properties to the reinforced papers, regardless the nature of the degraded paper.

The wettability of the samples was studied using the dynamic contact angle. To compare the effects of treatments, the dynamic contact angle values were normalized in relation to the corresponding initial values at 0 s (Fig. 6). As can be observed, each book has a different wettability, that is qualitatively maintained when the papers are reinforced with JP. In the case of being lined

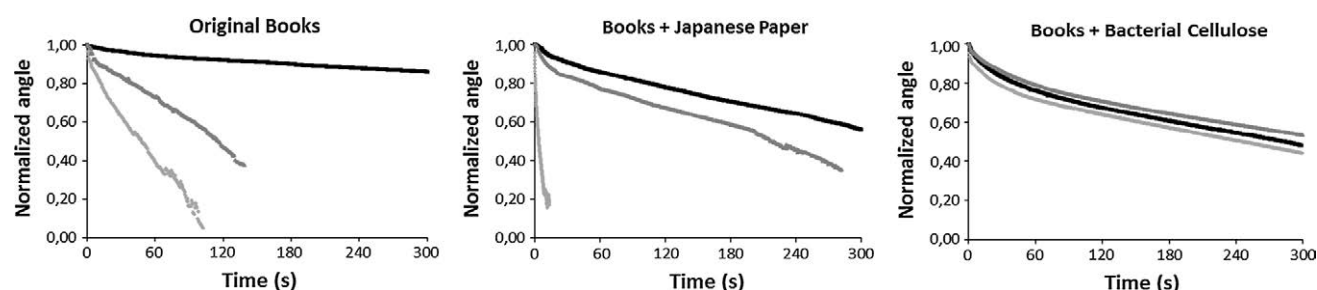


Fig. 6 The dynamic contact angle of lined and non-lined samples. Book 1 (*light grey square*), Book 2 (*grey square*), Book 3 (*black grey square*)

with BC, the three analyzed books showed similar behavior, which means that the resulting wettability seems to be independent of the paper to restore, which confirms the previous results.

The influence of the BC structure in the air permeability of the samples was assessed based on Gurley air permeance. All the original books have Gurley air permeance values in the range of 20–40 s. When they are reinforced with JP, these values are not significantly modified, not even after the aging process. On the contrary, if the papers were reinforced with BC, Gurley air permeance values are always higher than 900 s. This result indicates that the closed structure of the BC prevents the air flow through, which is in concordance with Yousefi et al. [28], who found that paper made with BC has no air permeability. The reinforcement with BC could result in protection of book against atmospheric pollutants, which is a major cause of paper degradation [29].

Conclusions

When degraded books are lined with BC, their mechanical properties are improved; burst and tear indexes increase or, at least, remain similar to the original value, even after the aging process.

When focusing on optical properties, it is concluded that lining with BC modified them up to 18 points (for gloss), while changes with JP are minor, always being less than 5 points. However, the legibility of the texts is much better when books are reinforced with BC, which is very important when the documents to restore have a high historical value.

As the papers to restore must be conserved because of their value, it should be adequate to have a reinforcing material with a very close structure, in order to protect the documents from humidity and atmospheric pollutants, which are two of the most important agents in paper degradation. BC provides adequate protection to avoid the effects of these possible degradation agents, regardless of the paper to restore.

This study suggests that BC is a promising material for restoration of paper documents because its characteristics and its high stability over time indicate that it can contribute to the reinforcement of degraded paper.

In view of all these properties, it can be concluded that BC could be appropriate for lining. Although this characterization is specific to the selected BC and JP, it is expected that the results do not differ much while considering other types of BC and JP.

Acknowledgements The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via Project CTQ 2010-17702, and the Madrid Regional Government via Project RETO PROSOST P2013-MAE2907.

References

1. Sjöström E, Westermarck U (1999) Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Sjöström E, Alen R (eds) *Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking*. Springer, New York, pp 1–19
2. Lindström T (2009) Sizing. In: Ek M, Gellerstedt G, Henriksson G (eds) *Pulp and paper chemistry and technology*, vol 3., De Gruyter, Stockholm, Sweden, pp 275–318
3. Ahn K, Rosenau T, Potthast A (2013) The influence of alkaline reserve on the aging behavior of book papers. *Cellulose* 20:1989–2001
4. Sparks P (1990) *Technical considerations in choosing mass deacidification processes*. Washington, D.C., Commission on Preservation and Access
5. Ardelean E, Bobu E, Niculescu GH, Groza C (2011) Effects of different consolidation additives on ageing behavior of archived document paper. *Cell Chem Technol* 45:97–103
6. Bansa H, Ishii R (1997) The effect of different strengthening methods on different kinds of paper. *Restaurator* 18:51–72
7. Chávez-Pacheco JL, Martínez-Yee S, Contreras-Zentella M, Escamilla-Marván E (2004) Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Rev Esp Cienc Quím Biol* 7:18–25
8. El-Saied H, El-Diwany AI, Basta AH, Atwa NA, El-Ghawas DE (2008) Production and characterization of economical bacterial cellulose. *BioResources* 3:1196–1217
9. Yamanaka S, Watanabe K, Kitamura N, Iguchi M, Mitsunashi S, Nishi Y, Uryu M (1989) The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J Mater Sci* 24:3141–3145. doi:10.1007/BF01139032
10. Retegi A, Gabilondo N, Peña C, Zuluaga R, Castro C, Gañán P, de la Caba K, Mondragon I (2010) Bacterial cellulose films with

- controlled microstructure-mechanical property relationships. *Cellulose* 17:661–669
11. Brown RM (1989) Microbial cellulose as a building block resource for specialty products and processes therefore, PCT Int Appl WO 8912107 A1, 37
 12. Watanabe K, Eto Y, Takano S, Nakamori S, Shibai H, Yamanaka S (1993) A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. *Cytotechnology* 13:107–114
 13. Jonas R, Farah L (1998) Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad Stab* 59:101–106
 14. Shah J, Brown RM (2005) Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:352–355
 15. Sokolnicki AM, Fisher RJ, Harrah TP, Kaplan DL (2006) Permeability of bacterial cellulose membranes. *J Membr Sci* 272:15–27
 16. Czaja W, Young DJ, Kawechi M, Brown RM (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 8:1–12
 17. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S (2001) Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26:1561–1603
 18. Woehl MA, Canestraro CD, Mikowski A, Sierakowski MR, Ramos LP, Wypych F (2010) Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: effect of enzymatic treatment on mechanical properties. *Carbohydr Polym* 80:866–873
 19. Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A (2000) Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *J Mater Sci* 35:261–270. doi:[10.1023/A:1004775229149](https://doi.org/10.1023/A:1004775229149)
 20. Santos SM, Carbajo JM, Villar JC (2013) The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. *BioResources* 8:3630–3645
 21. Santos SM, Carbajo JM, Quintana E, Ibarra D, Gomez N, Ladero M, Eugenio ME, Villar JC (2015) Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper. *Carbohydr Polym* 116:173–181
 22. Hestrin S, Schramm M (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J* 58:345–352
 23. Chinga-Carrasco G, Kauko H, Myllis M, Timonen J, Wang B, Zhou M, Fossum JO (2008) New advances in the 3D characterization of mineral coating layers on paper. *J Microsc* 232:212–224
 24. Zou X, Uesaka T, Gurnagul N (1996) Prediction of paper permanence by accelerated aging I. Kinetic analysis of the aging process. *Cellulose* 3:243–267
 25. Lojewska J, Missori M, Lubanska A, Grimaldi P, Zieba K et al (2007) Carbonyl groups development on degraded cellulose. Correlation between spectroscopic and chemical results. *Appl Phys A Mater* 89:883–887
 26. Moutinho I, Figueiredo M, Ferreira PJ (2004) Influência dos agentes de colagem superficial na estrutura do papel—uma análise química. In: Jiménez L, Villar JC (eds) *Proceedings of III CIADICYP*. INIA, Madrid, pp 377–383
 27. Etzler FM, Buche M, Bobalek JF, Weiss MA (1995) Surface free energy of paper and inks: printability issues. *Papermakers conference*, Chicago, TAPPI Press: pp 383–394
 28. Yousefi H, Faezipour M, Hedjazi S, Mousavi MM, Azusa Y, Heidaria AH (2013) Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers/ground cellulose nanofibers of canola straw. *Ind Crops Prod* 43:732–737
 29. Area C, Cheradame H (2011) Paper aging and degradation: recent findings and research methods. *BioResources* 6:5307–5337